

## 4 Evaluación de los N-metilinhidores

### 4.1 Ensayos biológicos

#### 4.1.1 Elección de una línea celular

El objetivo del ensayo biológico que se ha utilizado en esta tesis es comprobar el efecto que producen las nuevas moléculas sobre la toxicidad de A $\beta$ . Por ello es necesario escoger células que presenten una especial sensibilidad a esta proteína, como sucede con las células de tipo neuronal (no hay que olvidar que, aunque A $\beta$  es secretada en otras partes del organismo, únicamente se ha descrito su deposición *in vivo* y su consiguiente toxicidad en el cerebro).

Algunas de las diversas líneas celulares que han sido utilizadas en la investigación de procesos que implican A $\beta$  se resumen en la Tabla 8.

Otro factor a tener en cuenta a la hora de valorar las diferentes líneas celulares es la dificultad que conlleva su manipulación. De forma general podemos afirmar que las líneas celulares primarias o cultivos primarios<sup>\*</sup> requieren un proceso más laborioso de obtención y cultivo, por lo que son menos adecuadas que las líneas inmortalizadas o establecidas para llevar a cabo escrutinios masivos de compuestos. La obtención de células de una línea primaria implica el sacrificio de numerosos animales, normalmente neonatos, y la extracción de dichas células en un espacio de tiempo breve, requiriendo práctica y una elevada sincronización entre la preparación de muestras peptídicas y la obtención de células. Además, las células obtenidas de esta forma frecuentemente no son susceptibles de ser subcultivadas, lo que implica la necesidad de sacrificar nuevos animales para cada experimento y hace que el riesgo de que se contaminen durante su obtención sea mayor. Por todo ello se descartó en estos estadios iniciales de la investigación la utilización de líneas celulares primarias en el escrutinio biológico (*screening*) de los compuestos sintetizados.

---

\* Se denominan cultivos primarios a aquellos obtenidos directamente de tejidos u órganos. Una vez subcultivados (transplantados del contenedor original) se obtienen los denominados cultivos secundarios<sup>146</sup>.

#### 4 Evaluación de los N-metilinhibidores

Tipo de cultivo	Línea celular	Péptido ensayado
Línea celular inmortalizada	PC12 <sup>137,138,139,140,141</sup>	$\beta(25-35)$ , $\beta(1-39)$ , $\beta(1-40)$ , $\beta(1-42)$
	U-373-MG <sup>137</sup>	
	SK-N-MC neuroblastoma <sup>137</sup>	$\beta(25-35)$
	SH-SY5Y <sup>137</sup>	
	IMR-32 <sup>142</sup>	$\beta(1-42)$
Cultivo primario	Células de córtex de embrión de rata <sup>137</sup>	$\beta(25-35)$
	Células de hipocampo de rata (varias edades) <sup>143,144</sup>	$\beta(25-35)$ , $\beta(1-40)$ , $\beta(1-42)$

**Tabla 8.** Resumen de líneas celulares utilizadas en la investigación con A $\beta$ .

El estudio llevado a cabo por Shearman y colaboradores<sup>137</sup> demuestra la idoneidad de la línea celular PC12 frente a otras líneas celulares secundarias. Estas células presentan una elevada sensibilidad a la proteína A $\beta$  ( $\beta(1-40)$  y  $\beta(1-39)$  entre otras) y su utilización en ensayos equivalentes al que deseamos llevar a cabo se encuentra ampliamente documentada. Además, si comparamos las concentraciones de A $\beta$  a las que se obtiene la máxima respuesta en células PC12 (entre 1 y 10  $\mu$ M, dependiendo de la secuencia A $\beta$ ) con los valores descritos, por ejemplo, para las células IMR-32 por Soto y colaboradores (50-60  $\mu$ M), se aprecia la ventaja de trabajar con las primeras. La utilización de valores de concentración de A $\beta$  elevados obliga a preparar disoluciones madre de A $\beta$  concentradas, lo cual no siempre es posible debido a la baja solubilidad de las proteínas amiloides.

Teniendo en cuenta que las células PC12 son, junto con los cultivos primarios derivados de cerebro de rata, las de uso más habitual, y el hecho de que resultan mucho más fáciles de obtener y manipular que los cultivos primarios, se escogió la línea celular PC12 para la evaluación de los péptidos sintetizados en la presente tesis.

<sup>137</sup> Shearman, M. S.; Ragan, C. I.; Iversen, L. L. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1994**, *91*, 1470-1474.

<sup>138</sup> Lowe, T. L.; Strzelec, A.; Kiessling, L. L.; Murphy, R. M. *Biochemistry* **2001**, *40*, 7882-7889.

<sup>139</sup> Reixach, N.; Crooks, E.; Ostresh J. M.; Houghten, R. A.; Blondelle, S. E. *J. Struct. Biol.* **2000**, *130*, 247-258.

<sup>140</sup> Bohrmann, B.; Adrian, M.; Dubochet, J.; Kuner, P.; Müller, F.; Huber, W.; Nordstedt, C.; Döbeli, H. *J. Struct. Biol.* **2000**, *130*, 232-246.

<sup>141</sup> Hertel, C.; Terzi, E.; Hauser, N.; Jacob-Rötne, R.; Seeling, J.; Kemp, J. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1997**, *94*, 9412-9416.

<sup>142</sup> Soto, C.; Sigurdsson, E. M.; Morelli, L.; Kumar, R. A.; Castaño, E. M.; Frangione, B. *Nature Med.* **1998**, *4*, 822-826.

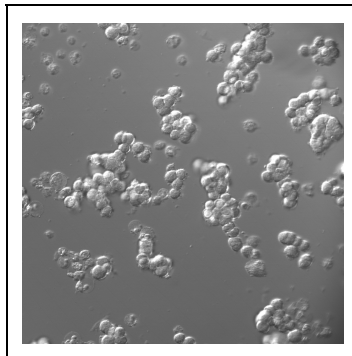
<sup>143</sup> Brewer, G. J. *Neurobiol. Aging* **1998**, *6*, 561-568.

<sup>144</sup> Lorenzo, A.; Yanker, B. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1994**, *91*, 12243-12247.

### 4.1.1.1 Características de la línea celular PC12

Las células PC12 fueron descritas por primera vez en 1976 por Greene y Tischler<sup>145</sup>, quienes las obtuvieron de feocromocitoma<sup>♦</sup> de rata. Esta línea celular se utiliza comúnmente en el estudio del desarrollo y de la función neuronal, presentando dos comportamientos muy diferentes según el protocolo de cultivo utilizado. Si las células PC12 se cultivan en medio con suero, éstas adoptan una morfología esférica, pudiendo proliferar hasta elevadas densidades y presentando muy baja adherencia, por lo que mayoritariamente crecen formando agrupaciones (ver Figura 47). Además, en estas condiciones presentan muchas de las características asociadas a las células adrenales cromafines inmaduras y simpáticas.

Cuando se utiliza factor de crecimiento nervioso (NGF) en lugar de suero, las células sufren diferenciación neuronal: dejan de dividirse, se vuelven excitables eléctricamente y desarrollan neuritas ramificadas, adquiriendo gradualmente muchas de las características de las neuronas simpáticas maduras<sup>146</sup>.



**Figura 47.** Micrografía de campo claro de células PC12 (cepa suministrada por ATCC) cultivadas en medio RPMI. La presencia de agrupaciones de células es notable.

La utilización de células PC12 en el estudio del efecto de la proteína A $\beta$  se realiza normalmente sin estimular la diferenciación neuronal, es decir, en ausencia de NGF ya que algunos estudios indican que el estado de diferenciación es indistinto en estos ensayos<sup>137</sup>, lo que simplifica la utilización de esta línea celular.

<sup>145</sup> Greene, L. A.; Tischler, A. S. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1976**, *73*, 2424-2428.

<sup>♦</sup> El feocromocitoma es un tipo de tumor derivado de las cápsulas adrenales.

<sup>146</sup> Teng, K. K.; Angelastro, J. M.; Cunningham, M. E.; Farinelli, S. E.; Greene, L. A. *Cell Biology: a Laboratory Handbook, Vol. 1.* Academic Press, San Diego, **1998**.

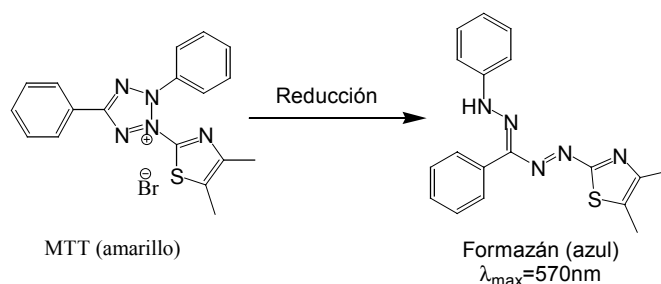
## 4 Evaluación de los N-metilinhibidores

Un inconveniente de las células PC12 es su tendencia a mutar, dando lugar a nuevas variantes, que pueden aumentar la heterogeneidad de la población e, incluso, conducir a la aparición de subpoblaciones fenotípicamente diferentes de la cepa original<sup>147,♦</sup>.

### 4.1.1.2 Valoración del efecto de A $\beta$ en las células PC12

La presencia de A $\beta$  en el medio de cultivo produce una disminución de la viabilidad celular. Esta reducción en el número de células viables puede ser medida utilizando diversos indicadores (incorporación de [<sup>3</sup>H]-timidina, actividad de la lactato deshidrogenasa, tinción del ADN/ARN con naranja de acridina-bromuro de etidio, etc.), aunque con elevada frecuencia se utiliza la inhibición en el mecanismo de reducción del bromuro de (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio (MTT) en los experimentos biológicos con A $\beta$ .

El ensayo de reducción de MTT es un método colorimétrico cuantitativo que se basa en la apertura del anillo de la sal de tetrazolio, MTT, en el interior de las mitocondrias de las células vivas, por acción de un enzima denominado succinato deshidrogenasa. El formazán es el producto resultante y es insoluble en medio acuoso, formando cristales de color azul oscuro que son disueltos mediante el uso de disolventes orgánicos (ver Figura 48).



**Figura 48.** Proceso de reducción del MTT (ver texto).

La inhibición de la reducción celular de MTT no mide exclusivamente la muerte celular, sino que también es un indicativo de daño en el metabolismo celular: cuando se produce una inhibición de la reducción celular de MTT ésta puede ser seguida por una cascada de mecanismos de señales degenerativas que conducen, en última instancia, a la

<sup>147</sup> Banker, G.; Goslin, K. *Culturing Nerve Cells*, The MIT Press, London, **1991**.

♦ Este comportamiento, común en las líneas celulares establecidas, se da con mayor frecuencia en las células PC12, siendo un hecho conocido que la cepa distribuida por ATCC, uno de los distribuidores de células más importantes en la actualidad, difiere fenotípicamente de la cepa original<sup>147</sup>.

muerte celular. En el caso de las células PC12, la inhibición del mecanismo de reducción de MTT se ha propuesto como indicativo de una muerte apoptótica<sup>137</sup>.

### 4.1.2 Validación del ensayo biológico con células PC12

La primera parte de los experimentos biológicos se realizó en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de Barcelona (IIBB) bajo la dirección del Dr. Joan Serratosa y el Dr. Josep María Tusell. La línea celular PC12 utilizada normalmente en el IIBB para los experimentos de viabilidad celular es una variante de la cepa original, la cual mantiene las características de ésta pero presenta la particularidad de crecer adherida al sustrato sólido y se comporta de forma óptima en medio DMEM suplementado<sup>148</sup>.

La última parte de los experimentos biológicos se realizó en los Serveis Científico-Tècnics de la Universitat de Barcelona (SCT), en la *Unidad de microscopía confocal y micromanipulación celular*, bajo la supervisión de la Dra. Susana Castel. La línea celular PC12 utilizada en el SCT es una variante suministrada por ATCC, la cual crece mayoritariamente en suspensión y presenta una menor adherencia al sustrato sólido que la cepa utilizada en el IIBB.

Las condiciones óptimas del ensayo de viabilidad dependen tanto de la línea celular como de la cepa utilizada. En el caso de la cepa del IIBB, estas condiciones ya se habían establecido previamente<sup>148</sup>. En el SCT, la utilización de una cepa diferente hizo necesario verificar y, posteriormente optimizar, las condiciones más adecuadas para realizar el ensayo de viabilidad.

#### 4.1.2.1 Optimización del ensayo biológico en los SCT-UB.

##### 4.1.2.1.1 Ensayo de proliferación celular con MTT

Las pruebas iniciales realizadas en el SCT con la variante de células PC12 suministrada por ATCC, permitieron observar, como era de esperar, un grado de adhesión inferior al mostrado por la cepa de células PC12 utilizada en el IIBB, además de presentar una mayor tendencia a formar agrupaciones.

---

<sup>148</sup> Rabanal, F.; Tusell, J. M.; Sastre, L.; Quintero, M. R.; Cruz, M.; Grillo, M. D.; Pons, M.; Albericio, F.; Serratosa, J.; Giralt, E. *J. Pept. Sci.*, **2002**, 8, 578-588.

#### 4 Evaluación de los N-metilinhidores

---

El cultivo de células PC12 se puede realizar utilizando diversos medios de cultivo, entre ellos RPMI 1640 y *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM), suplementados convenientemente. El medio de cultivo DMEM+ es el más adecuado para la cepa utilizada en el IIBB, pero frecuentemente se recomienda<sup>147,149</sup> el medio RPMI+ para reducir la aparición de variantes de la cepa original y su utilización para realizar ensayos de toxicidad de A $\beta$  se encuentra descrita para cepas suministradas por ATCC<sup>150</sup>.

Teniendo en cuenta esto, se decidió realizar diversos ensayos de proliferación celular destinados a optimizar tanto las condiciones de cultivo, como el ensayo de viabilidad celular de la nueva cepa de células PC12. Se introdujeron por tanto dos variables: el medio de cultivo utilizado (DMEM ó RPMI) y el cambio o no del medio durante el experimento de viabilidad (al cambiar el medio se aspira el sobrenadante, lo que puede arrastrar las células poco adheridas).

El efecto de estas variables se evaluó utilizando el ensayo de MTT que se emplea para cuantificar la citotoxicidad de A $\beta$ , realizando medidas a diferentes concentraciones de células para comprobar la dispersión y el rango de linealidad del ensayo de viabilidad para los dos medios de cultivo (RPMI+ y DMEM+), reemplazando y sin reemplazar el medio 24 h después del sembrado.

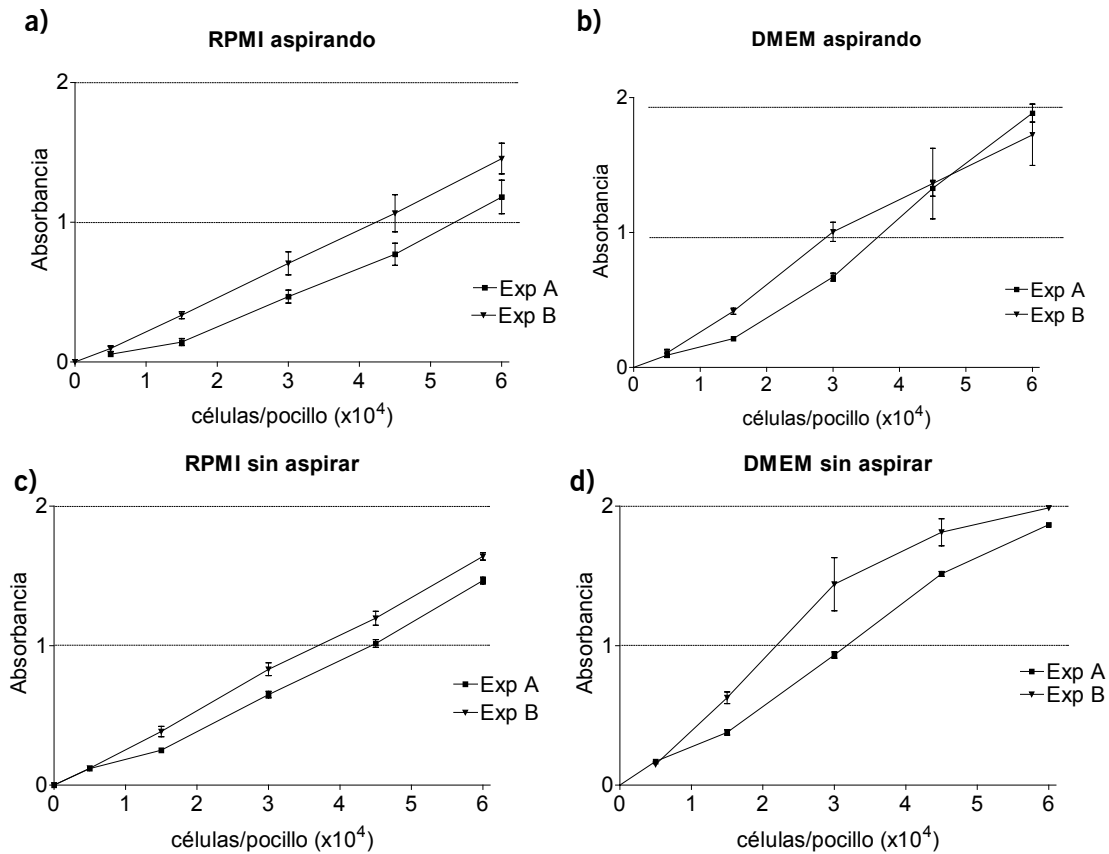
Los resultados obtenidos en dos experimentos independientes, experimento A (Exp A) y experimento B (Exp B), llevados a cabo como se describe en el apartado 8.4.2.4, se pueden ver en la Figura 49.

En ambos casos puede verse claramente una reducción de la absorbancia si comparamos las muestras a las que se les aspiró el medio tras 24 h con aquéllas en las que no se realizó la aspiración. Esto es debido a la baja adherencia que presenta esta cepa de células PC12, la cual tiene como resultado una mayor pérdida mecánica de células al eliminar el medio de cultivo. Las pequeñas diferencias en el grado de adhesión de las células y en el proceso de aspirado conllevan también un aumento de la dispersión en las muestras en las que se aspiró el medio frente a aquéllas en las que no se llevó a cabo dicha aspiración.

---

<sup>149</sup> Greene, L.; Aletta, J. M.; Rukenstein, A.; Green, S. H. *Methods Enzymol.* **1987**, *147B*, 207-216.

<sup>150</sup> Ghanta, J.; Shen, C.; Kiessling, L. L.; Murphy, R. M. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 29525-29528.



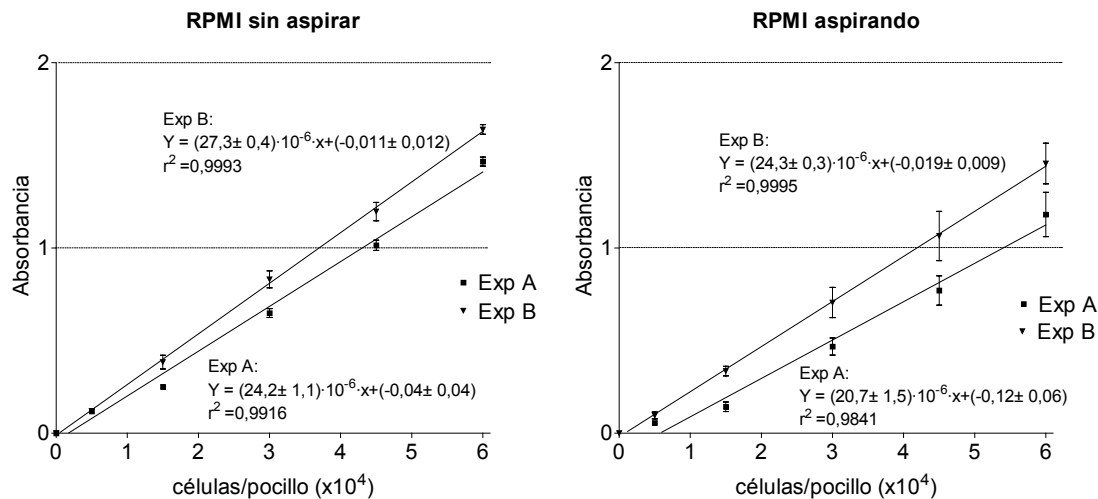
**Figura 49.** Resultado de diferentes ensayos de proliferación celular con MTT. a) y c) fueron realizados en medio RPMI suplementado, mientras que b) y d) se hicieron en DMEM suplementado. Tanto en a) como en b) el medio fue aspirado 24 h después de la siembra. Cada punto es el promedio de 4 medidas y las barras indican la desviación estándar. Las dos series de experimentos mostradas se indican como Exp A y Exp B.

Otro motivo de dispersión que se detectó durante la realización de estos experimentos es la presencia de agrupaciones de células de elevado tamaño. La variante de células PC12 suministrada por ATCC tiene una elevada tendencia a agregarse entre ellas, por lo que si estos agregados no se disocian, los resultados obtenidos presentan una mayor dispersión (resultados no mostrados). Para minimizarlo, en el protocolo de siembra de células en el SCT (apartado 8.4.2.1 y 8.4.2.2), se procedió a la estrusión de las células a través de una aguja de 0,8 mm de diámetro.

En los ensayos de proliferación celular obtenidos en medio RPMI se observa una diferencia entre los valores absolutos de los experimentos A y B (los valores del experimento B son siempre ligeramente superiores). Este comportamiento puede ser debido a pequeñas variaciones en las concentraciones utilizadas en cada experimento respecto a la concentración nominal (el cálculo de la concentración de células tiene un error relativamente grande, sobre todo en el caso de células PC12, con elevada tendencia a formar agregados y rápida sedimentación). Por otro lado se aprecia que, tanto las

## 4 Evaluación de los N-metilinhibidores

muestras en RPMI a las que se cambió el medio por aspiración tras 24 h, como aquéllas a las que no se les cambió, presentan una gran correlación lineal entre la absorbancia y el número de células por pocillo, tal y como se muestra en la Figura 50.



**Figura 50.** Ajuste lineal de los valores obtenidos utilizando medio RPMI (experimento A y experimento B).

Los experimentos realizados utilizando medio DMEM muestran valores en los ensayos de proliferación celular con MTT superiores a los obtenidos con medio RPMI, aunque presentan un comportamiento poco lineal. En el caso concreto del experimento B de la Figura 49 se llega a apreciar un proceso de pérdida de linealidad por saturación. Resultados no presentados en los anteriores gráficos permitieron verificar esta observación: cuando se trabaja con más de  $\sim 70.000$  células/pocillo en medio DMEM se obtienen valores de absorbancia prácticamente constantes.

Tras estas observaciones experimentales se escogieron las siguientes condiciones para realizar los experimentos con la variante de células PC12 suministrada por ATCC en presencia de A $\beta$  y/o los péptidos sintetizados:

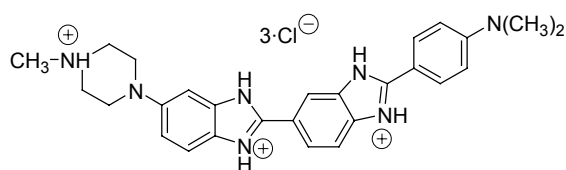
- ◆ Medio de cultivo: RPMI 1640 suplementado.
- ◆ Concentración de células:  $2,8 \cdot 10^5$  cél./mL, 100  $\mu$ L en cada pocillo.

Como se sospechaba, el cambio de cepa de células PC12 hace que las condiciones óptimas del ensayo de viabilidad varíen respecto a las utilizadas en el IIBB. No obstante, el mejor comportamiento mostrado por estas células en medio RPMI durante los ensayos de proliferación celular con MTT es motivo suficiente como para introducir dicha modificación en los futuros ensayos realizados en el SCT con esta variante de células.

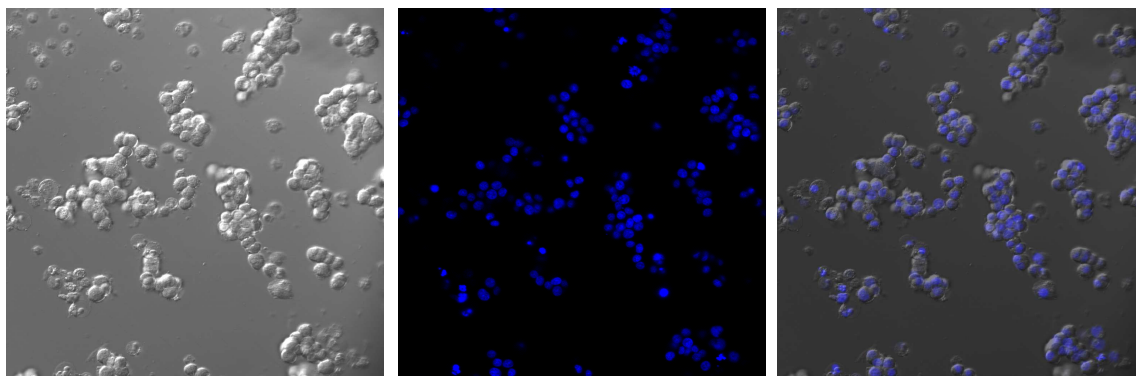


Además, para poder trabajar con valores de absorbancia inferiores a 1 se redujo el número de células por pocillo respecto al utilizado previamente en el IIBB.

Para comprobar el estado de las células PC12 en estas condiciones de cultivo se utilizó el fluoróforo Hoechst 33342 (HO, ver Figura 51) (apartado 8.4.2.8). La membrana celular es permeable a este compuesto, que presenta fluorescencia en el espectro del azul al unirse al surco pequeño del DNA de células vivas. En la Figura 52 se ve el aspecto que muestran las células PC12 utilizadas en el SCT al ser observadas en un microscopio de fluorescencia.



**Figura 51.** Estructura del compuesto Hoechst 33342.



**Figura 52.** Células PC12 incubadas con HO. La primera imagen muestra las células PC12 observadas bajo luz visible, la segunda muestra el aspecto de la preparación al observar la fluorescencia a 460 nm. Por último, se muestra la superposición digital de ambas imágenes.

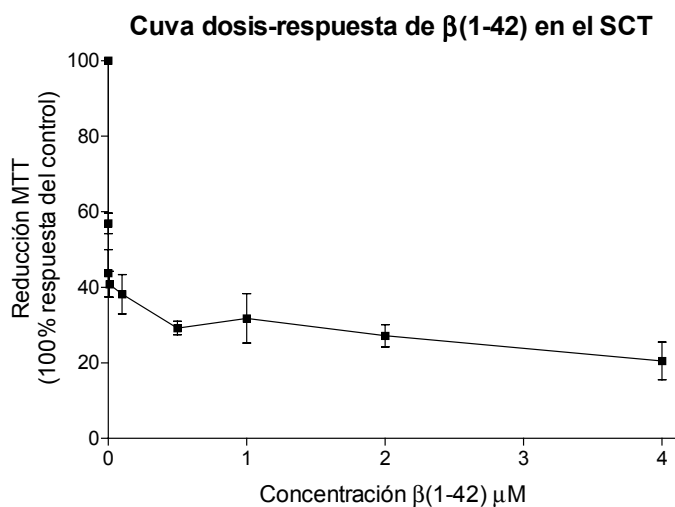
#### 4.1.2.1.2 Verificación del ensayo de viabilidad celular con MTT en presencia de $\beta(1-42)$

Una vez fijadas las condiciones con las que se realizarán los ensayos de viabilidad celular en presencia de  $A\beta$  en el SCT es necesario comprobar que, tras los cambios introducidos, el comportamiento general de las células PC12 al ser tratadas con  $\beta(1-42)$  no varía de forma sustancial respecto al comportamiento observado con anterioridad.

Con este fin se realizó nuevamente, en las condiciones de trabajo establecidas en el apartado 4.1.2.1.1, la curva dosis-respuesta de  $\beta(1-42)$  envejecido. El envejecimiento del péptido se llevó a cabo sin introducir ninguna variación respecto al método utilizado en la

## 4 Evaluación de los N-metilinhibidores

preparación de muestras durante los experimentos en el IIBB (apartado 8.2.1.2). En la Figura 53 se muestra el resultado obtenido en este experimento.



**Figura 53.** Curva dosis-respuesta del péptido  $\beta(1-42)$  en el SCT. Los valores representados son la media de un mínimo de 2 experimentos independientes realizados dos veces por hexaplicado en un mismo experimento.

Este experimento muestra un gráfico dosis-respuesta equiparable al obtenido en el IIBB (la comparación de este perfil respecto al obtenido anteriormente se realiza en el apartado 4.1.2.3), lo que corrobora la validez del método puesto a punto en el SCT para la evaluación de la toxicidad de la proteína  $A\beta$ .

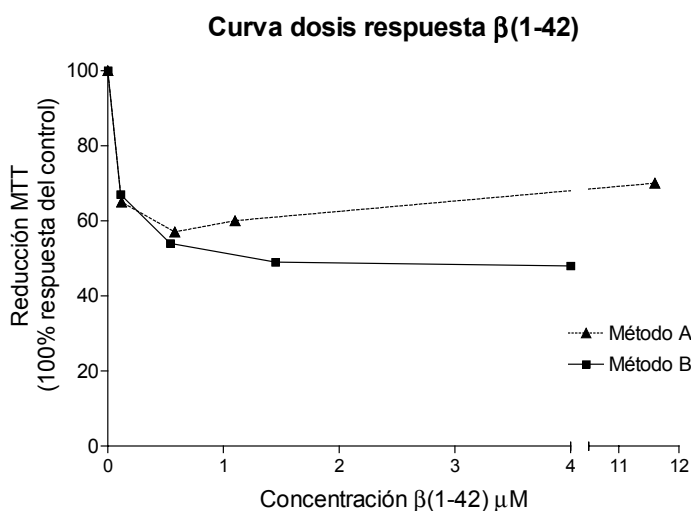
### 4.1.2.2 Optimización del ensayo biológico en el IIBB

#### 4.1.2.2.1 Experimentos con $\beta(1-42)$

La experiencia previa en el IIBB con la manipulación de células PC12 en presencia del péptido  $\beta(12-28)$ <sup>148</sup> hizo que, en este caso, sólo fuese necesario optimizar el ensayo biológico en presencia de  $\beta(1-42)$ . Para ello se procedió a establecer una curva dosis-respuesta de  $\beta(1-42)$ .

Un problema que se planteó inicialmente fue el método de preparación de la muestra de proteína  $\beta(1-42)$ . Finalmente, como se describe en el apartado 2.2.2.2, se escogieron dos posibles métodos de preparación de las muestras con  $\beta(1-42)$ . El primero (Método A) consiste básicamente en disolver la proteína en  $\text{NH}_3$  0,1 M y diluirla con agua, como se explica en el apartado 8.2.1.2.1. Con el método A se utiliza una concentración de péptido

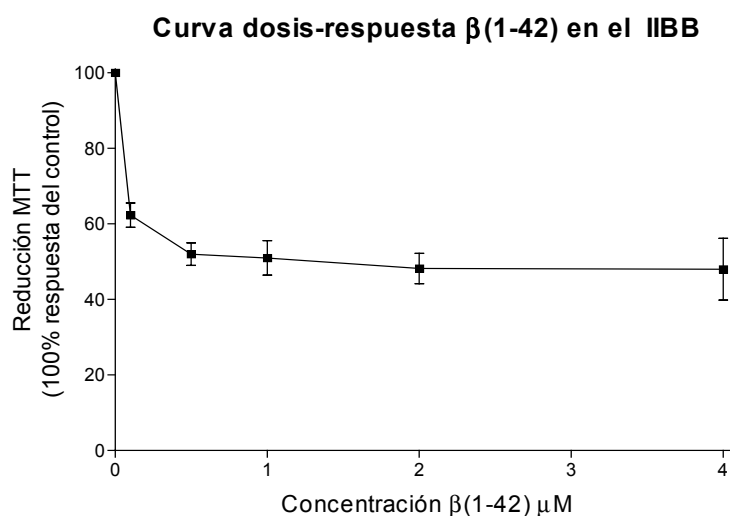
de  $\sim 170 \mu\text{M}$ . En el segundo método (Método B), la muestra se disuelve de forma secuencial en NaOH diluido, agua, y por último se añade como tampón fosfato sódico pH 7,4 y se elimina el precipitado, siendo la concentración final a la que se envejece el péptido de  $41 \mu\text{M}$  (apartado 8.2.1.2.2). En ambas preparaciones el péptido se envejece en paralelo durante 90 h.



**Figura 54.** Curva dosis-respuesta  $\beta(1-42)$  en células PC12. El péptido fue preparado según dos métodos diferentes, A y B, detallados en el texto. Los valores representan la media de nonaplicados.

Los resultados obtenidos con el método B muestran una curva dosis-respuesta estándar para un compuesto tóxico como es  $A\beta$  (una mayor dosis de  $A\beta$  produce una reducción en la viabilidad entendido en este caso como una disminución de la tasa de reducción metabólica de MTT). Por el contrario, el método A presenta una respuesta anómala (inicialmente la viabilidad celular disminuye con el aumento de  $A\beta$  para posteriormente volver a aumentar), debido quizás a que el proceso de fibrillogénesis tiene lugar, en este caso, a un valor de pH básico. Este resultado, unido a los inconvenientes que se detallan en el apartado 2.2.2.2.1 para este método de preparación de muestra, nos llevó a descartar el método A para la obtención de muestras de  $\beta(1-42)$  apropiadas para la realización de ensayos biológicos.

La realización de tres experimentos independientes utilizando el método B en la preparación del péptido  $\beta(1-42)$  dio como resultado la curva dosis-respuesta que se muestra en la Figura 55 (en este caso se utilizaron tiempos de envejecimiento de 93 horas  $\sim 4$  días).

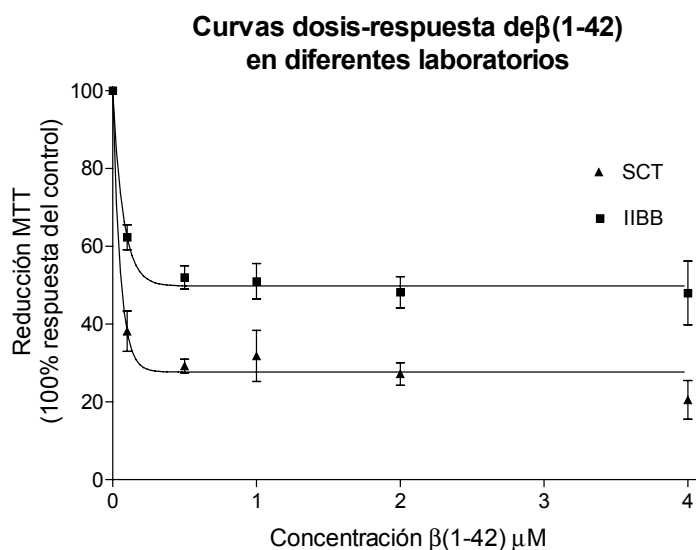


**Figura 55.** Curva dosis-respuesta obtenida para  $\beta(1-42)$  utilizando el método B de disolución. Los valores representan la media de tres experimentos independientes, cada uno de los cuales se obtuvo por promedio de nueve valores.

La curva dosis-respuesta obtenida muestra un comportamiento similar al referido por otros autores para sistemas de células PC12 utilizando protocolos similares (se han descrito valores de reducción de MTT respecto al 100% del control de aproximadamente un 35% para concentraciones de  $\beta(25-35)$ ,  $\beta(1-39)$  y  $\beta(1-40)$  del orden de 1-10  $\mu\text{M}$ <sup>137</sup>, mientras que otros estudios muestran valores en torno al 60% para concentraciones de  $\beta(1-40)$  iguales a 25  $\mu\text{M}$ <sup>138</sup> y otros afirman que está en torno al 35%<sup>141</sup> para concentraciones 1  $\mu\text{M}$  de  $\beta(25-35)$  o 300 nM de  $\beta(1-40)$  o 150 nM de  $\beta(1-42)$ ). Así mismo, en los experimentos realizados en el IIBB se introdujo, de forma sistemática, un control de toxicidad compuesto por  $\beta(25-35)$ . Esto permitió verificar en todos los casos que los valores de inhibición de la reducción de MTT obtenidos administrando la disolución envejecida de  $\beta(1-42)$  1  $\mu\text{M}$  y los obtenidos al aplicar una disolución de  $\beta(25-35)$  1  $\mu\text{M}$  eran similares (resultados no mostrados).

### 4.1.2.3 Comparación entre las curvas dosis-respuesta obtenidas en el IIBB y el SCT

En la Figura 56 se muestran los resultados obtenidos en el IIBB y en el SCT. En ambos casos se utilizó el mismo lote de A $\beta$  y el protocolo de preparación de  $\beta(1-42)$  descrito en el apartado 8.2.1.2.



**Figura 56.** Comparación de las curvas dosis-respuesta obtenidas en los dos laboratorios en los que se llevó a cabo el ensayo biológico. Los valores obtenidos en el SCT son el promedio de 4 o más experimentos independientes (cada uno es la media de 6 medidas). Los valores obtenidos en el IIBB son el promedio de 3 experimentos independientes (cada uno es la media de 9 medidas). Valores ajustados a un decaimiento exponencial.

La forma de la curva dosis-respuesta en ambos laboratorios es similar, aunque destaca claramente el hecho de obtener, en el SCT, valores de toxicidad bastante inferiores a los observados en el IIBB. Esto se puede deber a la disminución del número de células en cada pocillo (se ha verificado posteriormente que este factor no es la causa, resultados no mostrados), a la variación de las condiciones experimentales (se ha comprobado también que el uso de medio DMEM en la cepa utilizada en el SCT da valores de toxicidad de  $A\beta$  similares a los observados con RPMI) o, más probablemente, al cambio de cepa de células PC12.

Esta comparación muestra que la cepa de células PC12 suministrada por ATCC presenta una mayor sensibilidad a  $A\beta$  que la cepa utilizada en el IIBB, aunque ambas muestran una curva dosis-respuesta típica frente a este compuesto. A pesar de esta diferencia se decidió realizar los experimentos en el SCT con la cepa suministrada por ATCC.

### 4.1.3 Realización de los ensayos biológicos en presencia de los potenciales inhibidores de la agregación de A $\beta$

Debido a la mayor inhibición de la reducción de MTT que presenta la variante de células PC12 utilizadas en el SCT al ser tratadas con péptido A $\beta$  respecto a la variante del IIBB, los resultados obtenidos en los diferentes laboratorios se presentarán y discutirán por separado. Al final de este capítulo se realizará una discusión conjunta.

#### 4.1.3.1 Experimentos realizados en el IIBB

Los ensayos realizados en el IIBB se desarrollaron tal y como se describe en el apartado 8.4.1.3.

##### 4.1.3.1.1 *Ensayo de inhibición de la toxicidad de la proteína $\beta$ (1-42) utilizando compuestos peptídicos*

El objetivo de los ensayos que se describen en la presente tesis es desarrollar péptidos con capacidad de disminuir la toxicidad de A $\beta$ . Para ello, es necesario trabajar con valores de concentración, tanto de A $\beta$  como de los posibles inhibidores, que permitan detectar fácilmente un comportamiento de inhibición de la toxicidad.

Como se ha visto en la curva dosis-respuesta obtenida en el SCT, el valor de la inhibición de la reducción de MTT para concentraciones entre 0,5 y 4  $\mu$ M es prácticamente igual (al realizar una prueba ANOVA de un factor acompañada de un *test* Tukey para comparar cada valor con los restantes, se obtiene una probabilidad menor al 95% de que las respuestas obtenidas a 0,5 y a 4  $\mu$ M sean diferentes, por lo que ambos valores no pueden considerarse significativamente diferentes). A pesar de esta afirmación estadística, la concentración a la que se llevarán a cabo los experimentos es importante, ya que cuanto menor sea la concentración de A $\beta$ , menor toxicidad se obtendrá y quizás más fácil será ver un aumento en la supervivencia. Por contra, si consideramos que siempre existe un error en la cantidad de A $\beta$ <sup>\*</sup>, éste tendrá una mayor repercusión a concentraciones bajas. En cambio, si utilizamos concentraciones muy elevadas de A $\beta$  quizás sea necesario un compuesto con mucha actividad frente a A $\beta$  para ver un efecto

---

\* El error en la cuantificación de la cantidad de A $\beta$  utilizado con las células no sólo puede provenir del análisis de la muestra, sino que también se debe al hecho de trabajar con suspensiones no homogéneas.

por parte de dicho inhibidor. La ventaja en este caso sería que las inevitables pequeñas variaciones en la concentración nominal de A $\beta$  modificarían poco el resultado obtenido.

Finalmente se apostó por realizar una serie de experimentos a dos concentraciones diferentes. Se eligieron 1 y 2  $\mu$ M ya que se trata de la región donde se inicia la inflexión de la curva dosis-respuesta en las condiciones ensayadas.

Otra variable importante involucrada en la realización de estos ensayos son los equivalentes del potencial inhibidor que se van a utilizar. Debido a que deseamos ver un efecto cuantificable de nuestros compuestos sobre la proteína A $\beta$ , se decidió que los péptidos sintetizados se utilizarían siempre en exceso respecto a A $\beta$  (concretamente se escogió un exceso de 5 equivalentes, de forma que, en caso de tener un compuesto que interfiriese con A $\beta$ , éste fuese detectado fácilmente, manteniendo baja la concentración total del inhibidor y minimizando así posibles problemas de toxicidad). Las muestras para los ensayos de inhibición de la toxicidad de A $\beta$  fueron preparadas como se describe en el apartado 2.2.3.

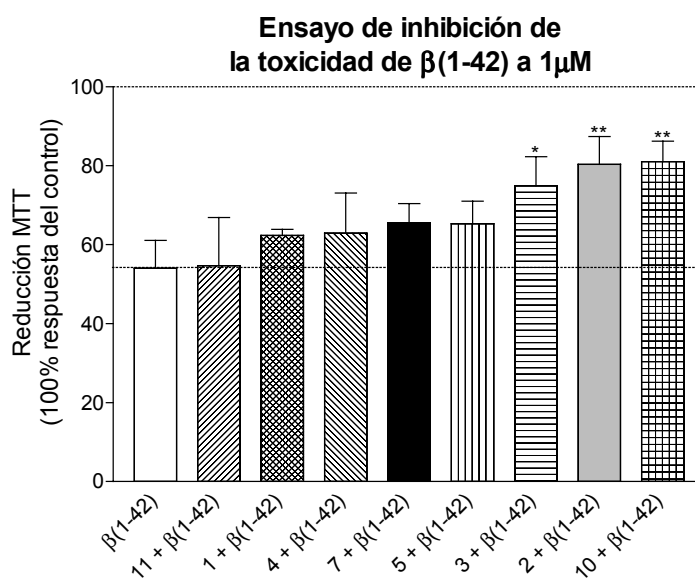
Los péptidos ensayados durante esta etapa del experimento se resumen en la Tabla 9, donde hay que resaltar dos péptidos: **10** y **11**, ambos inhibidores descritos en la bibliografía (son péptidos sin N-metilaminoácidos) y que se utilizan como compuestos de referencia en el ensayo de inhibición de toxicidad.

<b>Péptido</b>	<b>Secuencia del péptido</b>
<b>1</b>	Lys-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-NMeAla-NH <sub>2</sub>
<b>2</b>	Lys-Lys-Leu-Val-Phe-NMePhe-Ala-NH <sub>2</sub>
<b>3</b>	Lys-Lys-Leu-Val-NMePhe-Phe-Ala-NH <sub>2</sub>
<b>4</b>	Lys-Lys-Leu-NMeVal-Phe-Phe-Ala-NH <sub>2</sub>
<b>5</b>	Lys-Lys-NMeLeu-Val-Phe-Phe-Ala-NH <sub>2</sub>
<b>7</b>	Lys-Lys-NMeLeu-Val-NMePhe-Phe-Ala-NH <sub>2</sub>
<b>10</b>	Lys-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-NH <sub>2</sub>
<b>11</b>	Leu-Pro-Phe-Phe-Asp-OH

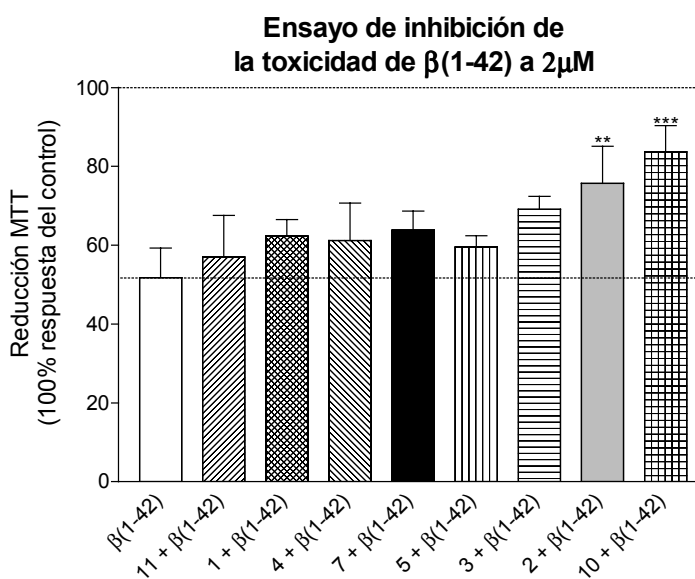
**Tabla 9.** Resumen de los péptidos ensayados en el IIBB, con sus correspondientes secuencias.

Los resultados obtenidos en los ensayos de inhibición de la toxicidad a 1 y 2  $\mu$ M de A $\beta$  se muestran en la Figura 57 y en la Figura 58, respectivamente.

#### 4 Evaluación de los N-metilinhibidores



**Figura 57.** Ensayo de inhibición de la toxicidad de  $\beta(1-42)$  utilizando diferentes péptidos. La concentración de  $A\beta$  en este experimento es  $1\mu\text{M}$ , mientras que la concentración de los potenciales inhibidores es  $5\mu\text{M}$ .



**Figura 58.** Ensayo de inhibición de la toxicidad de  $\beta(1-42)$  utilizando diferentes péptidos. La concentración de  $A\beta$  en este experimento es  $2\mu\text{M}$ , mientras que la concentración de los potenciales inhibidores es  $10\mu\text{M}$ .

Los experimentos a  $1$  y  $2\mu\text{M}$  de  $A\beta$  se realizaron de forma paralela, utilizándose la misma disolución madre de  $A\beta$  e inhibidor para preparar ambas diluciones. Cada valor representa la media de tres experimentos independientes (cada uno es la media de 9 valores), y las barras representan la desviación estándar. El tratamiento estadístico y el significado de los asteriscos se detalla en el apartado 8.4.3.

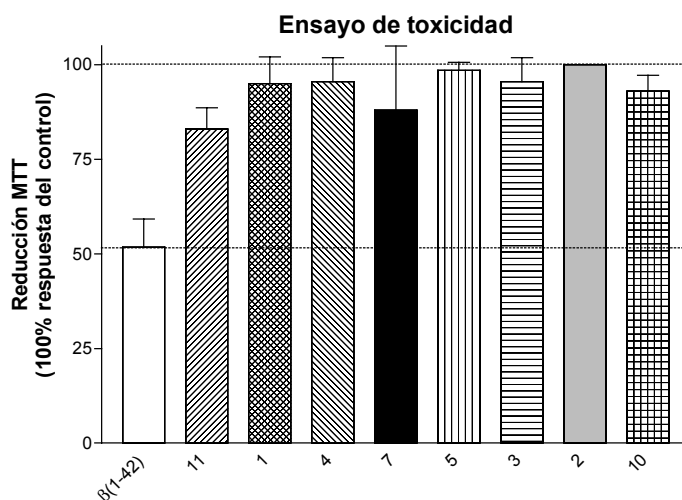


Este ensayo muestra resultados muy similares tanto a 1 como a 2  $\mu\text{M}$  de  $\text{A}\beta$ , aunque el tratamiento estadístico de los datos parece indicar que, tal y como habíamos pronosticado anteriormente, es más fácil detectar posibles candidatos utilizando una concentración 1  $\mu\text{M}$  (obtenemos tres compuestos con actividad biológica para  $\text{A}\beta$  1  $\mu\text{M}$  mientras que sólo se vuelven a identificar dos de estas moléculas al utilizar  $\text{A}\beta$  2  $\mu\text{M}$ ). Este resultado sirvió para decidir que los ensayos biológicos posteriores se realizarían únicamente a la concentración 1  $\mu\text{M}$  de  $\beta(1-42)$ .

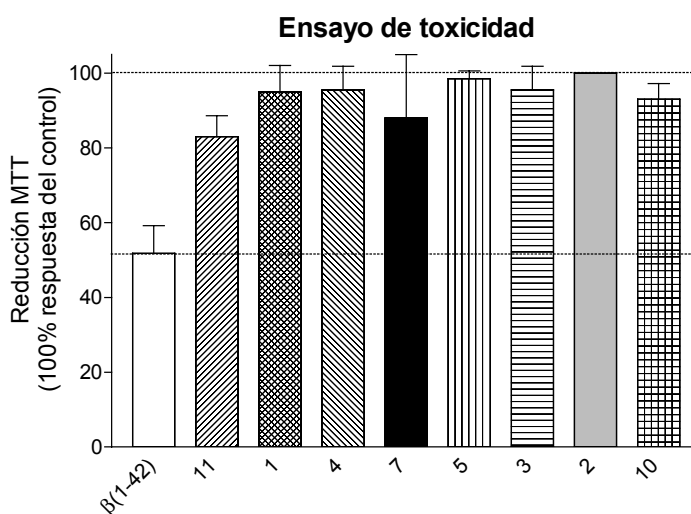
En este experimento se detecta que el compuesto **11** (Leu-Pro-Phe-Phe-Asp-OH), a pesar de estar descrito en la bibliografía como un buen inhibidor de la agregación y toxicidad de  $\text{A}\beta$ , no presenta una actividad inhibidora significativa en nuestro sistema, mientras que el compuesto **10**, también descrito, sí que dio un resultado positivo, equiparable al mostrado por nuestro mejor compuesto en esta serie de experimentos, **2**.

#### 4.1.3.1.2 Ensayo de toxicidad de los péptidos

La verificación de que las moléculas diseñadas no son tóxicas para las células PC12 se realizó mediante los correspondientes ensayos de toxicidad utilizando los inhibidores solos. Las concentraciones a las que se verificó la inocuidad de éstos fue la misma a la que se realizaron los ensayos de inhibición de la toxicidad de la proteína  $\text{A}\beta$  (5 y 10  $\mu\text{M}$ ). Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 59 y en la Figura 60. Las muestras fueron preparadas como se describe en el apartado 8.2.1.1.3.



**Figura 59.** Ensayo para determinar la toxicidad de  $\beta(1-42)$  de los diferentes péptidos sintetizados. La concentración de las moléculas es 5  $\mu\text{M}$ , excepto  $\text{A}\beta$ , que se encuentra a 1  $\mu\text{M}$ .



**Figura 60.** Ensayo para determinar la toxicidad de  $\beta(1-42)$  de los diferentes péptidos sintetizados. La concentración de las moléculas es 10  $\mu\text{M}$ , excepto  $\text{A}\beta$ , que se encuentra a 2  $\mu\text{M}$ .

En este ensayo, cada valor representa la media de dos experimentos independientes (cada uno es la media de 9 valores), y las barras representan la desviación estándar. Al realizar una prueba ANOVA de un factor acompañada de un *test* Tukey para comparar cada pareja de valores, se verifica que en ninguno de los dos casos los valores observados difieren significativamente entre ellos ni respecto al control de supervivencia (valor 100%). Es decir, ninguno de los péptidos ensayados ha demostrado ser tóxico.

### 4.1.3.2 Experimentos realizados en el SCT

Tras los resultados obtenidos en el IIBB, se decidió realizar los experimentos únicamente a la concentración de  $\text{A}\beta$  1  $\mu\text{M}$ , sin modificar la preparación de las muestras.

#### 4.1.3.2.1 Ensayo de inhibición de la toxicidad de la proteína $\beta(1-42)$

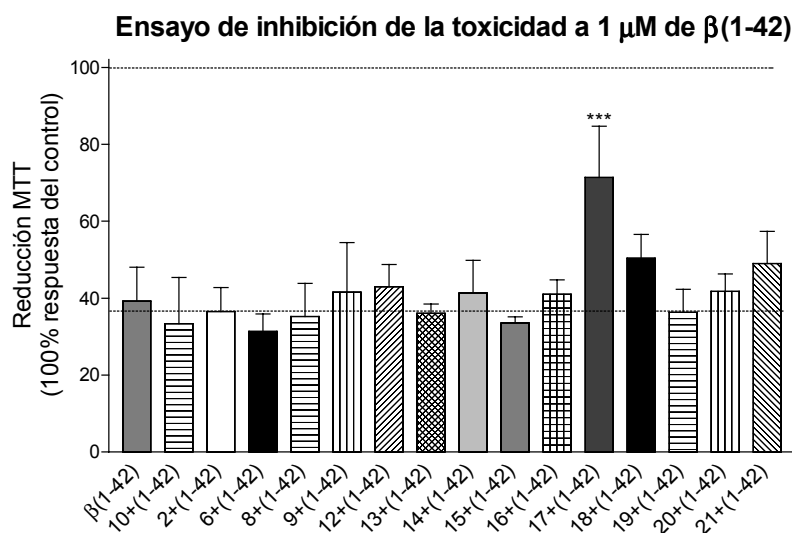
La preparación de las muestras ensayadas en el SCT se realizó siguiendo el protocolo utilizado durante la realización de los experimentos en el IIBB (apartado 8.2.1.2), introduciéndose únicamente una pequeña variación al realizar la dilución en medio de cultivo (apartado 8.4.2.5).

Los péptidos ensayados durante esta etapa del experimento se resumen en la Tabla 10. El péptido **10**, junto con **21**, es el único sin *N*-metilaminoácidos.

Péptido	Secuencia del péptido	Nº Metilos
2	Lys-Lys-Leu-Val-Phe-NMePhe-Ala-NH <sub>2</sub>	1
6	Lys-Lys-Leu-NMeVal-Phe-NMePhe-Ala-NH <sub>2</sub>	2
8	Lys-Lys-Leu-Val-NMePhe-Phe-NMeAla-NH <sub>2</sub>	2
9	Lys-Lys-NMeLeu-Val-NMePhe-Phe-NMeAla-NH <sub>2</sub>	3
16	Ala-NMePhe-Phe-Val-Leu-Lys-Lys-NH <sub>2</sub>	1
12	D-Lys-D-Lys-D-Leu-D-Val-D-Phe-D-NMePhe-D-Ala-NH <sub>2</sub>	1
13	D-Lys-D-Lys-D-NMeLeu-D-Val-D-Phe-D-Phe-D-Ala-NH <sub>2</sub>	1
14	D-Lys-D-Lys-D-Leu-D-Val-D-NMePhe- D-Phe- D-Ala-NH <sub>2</sub>	1
15	D-Lys-D-Lys-D-NMeLeu-D-Val-D-NMePhe-D-Phe-D-Ala-NH <sub>2</sub>	2
17	D-Ala-D-NMePhe-D-Phe-D-Val-D-Leu-D-Lys-D-Lys-NH <sub>2</sub>	1
18	D-Ala-D-Phe-D-Phe-D-Val-D-NMeLeu-D-Lys-D-Lys-NH <sub>2</sub>	1
19	D-Ala-D-Phe-D-NMePhe-D-Val-D-Leu-D-Lys-D-Lys-NH <sub>2</sub>	1
20	D-Ala-D-Phe-D-NMePhe-D-Val-D-NMeLeu-D-Lys-D-Lys-NH <sub>2</sub>	2
10	Lys-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-NH <sub>2</sub>	0
21	D-Ala-D-Phe-D-Phe-D-Val-D-Leu-D-Lys-D-Lys-NH <sub>2</sub>	0

**Tabla 10.** Resumen de los péptidos ensayados en el SCT (apartado 8.4.2), con sus correspondientes secuencias.

Los resultados obtenidos en los ensayos de inhibición de la toxicidad a 1  $\mu$ M de A $\beta$  se muestran en la Figura 61.



**Figura 61.** Ensayo de inhibición de la toxicidad de  $\beta$ (1-42) utilizando los péptidos de la Tabla 10. La concentración de A $\beta$  en este experimento es 1  $\mu$ M, mientras que la concentración de los potenciales inhibidores es 5  $\mu$ M.

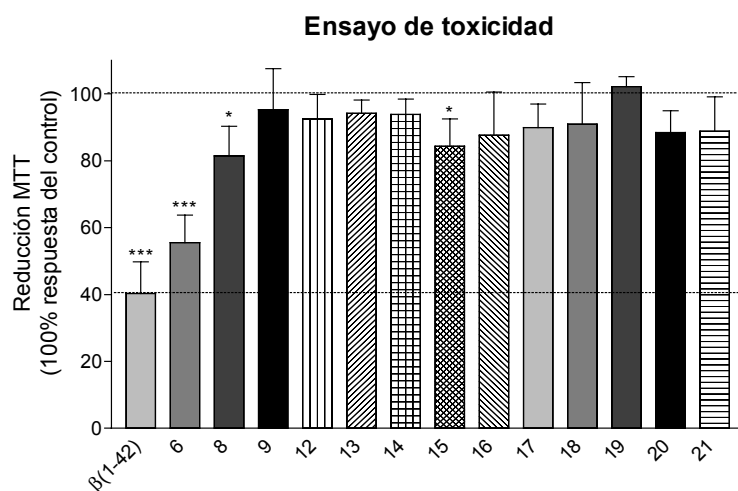
## 4 Evaluación de los N-metilinhibidores

En estos experimentos cada valor representa la media de tres o más experimentos independientes (cada uno es la media de 6 valores), y las barras representan la desviación estándar. El tratamiento estadístico y el significado de los asteriscos se detalla en el apartado 8.4.3.

En la Figura 61 destaca el buen comportamiento de la molécula **17** como inhibidor de la toxicidad de A $\beta$ . Dicha molécula **17** corresponde a la secuencia *retro-enantio* del inhibidor **2**, identificado como tal en el IIBB. También son destacables, pero en sentido contrario, el péptido **2** y el péptido **10**, los cuales habían presentado una respuesta muy buena anteriormente, y en este ensayo no muestran valores que se puedan diferenciar significativamente del obtenido para A $\beta$ . Esta contradicción podría estar relacionada con el aumento de la toxicidad que se ha detectado en los experimentos realizados en el SCT (las células PC12 utilizadas presentaron una mayor sensibilidad a A $\beta$ ).

### 4.1.3.2.2 Ensayo de toxicidad de los péptidos

La verificación de la ausencia de toxicidad por parte de las moléculas sintetizadas se llevó a cabo únicamente a la concentración 5  $\mu$ M (concentración de péptido utilizada en los ensayos de inhibición de la toxicidad de A $\beta$ ). La preparación de las muestras se realizó según se describe en el apartado 8.2.1.1.3.



**Figura 62.** Ensayo para determinar la toxicidad de  $\beta(1-42)$  de los diferentes péptidos sintetizados. La concentración de las moléculas es 5  $\mu$ M, excepto A $\beta$ , que se encuentra a 1  $\mu$ M.

Cada valor representa la media de un mínimo de tres experimentos independientes (cada uno es la media de 6 valores), y las barras representan la desviación estándar. El tratamiento estadístico y el significado de los asteriscos se detalla en el apartado 8.5.1.2.

Estos resultados indican claramente que tres de las secuencias ensayadas (dos di-N-metilpéptidos, **6** y **8**, y la secuencia *enantio* de uno de ellos, **15**) presentan una toxicidad no despreciable en cultivos de células PC12.

### 4.1.3.2.3 Ensayos biológicos adicionales

El número de péptidos ensayados hace poco ágil la realización de estudios dosis-respuesta y experimentos de disolución de fibras preformadas con todos ellos. Por este motivo, seleccionamos algunos de los compuestos que han mostrado mejor respuesta, junto con un compuesto que no ha presentado ni capacidad de inhibición de la agregación ni toxicidad, para llevar a cabo dichos experimentos.

De esta forma se escogieron inicialmente los dos mejores péptidos obtenidos en el IIBB (**2** y **10**) y el mejor del SCT (**17**). Además, se incluyeron los péptidos **18** y **21**, ya que aunque en el experimento anterior no difieren de forma estadísticamente significativa respecto a A $\beta$ , son los *segundos mejores* de dicha serie (si se aplica un análisis menos estricto, como es un test-t de Student de una cola, se obtiene que la respuesta de estos dos péptidos puede considerarse significativa, con un intervalo de confianza superior al 95%). También se decidió incluir el péptido **13**, el cual no presenta ni toxicidad ni capacidad de inhibir la toxicidad de A $\beta$ , para poder comparar sus resultados con los restantes péptidos.

#### 4.1.3.2.3.1 Disrupción de fibras amiloides preformadas

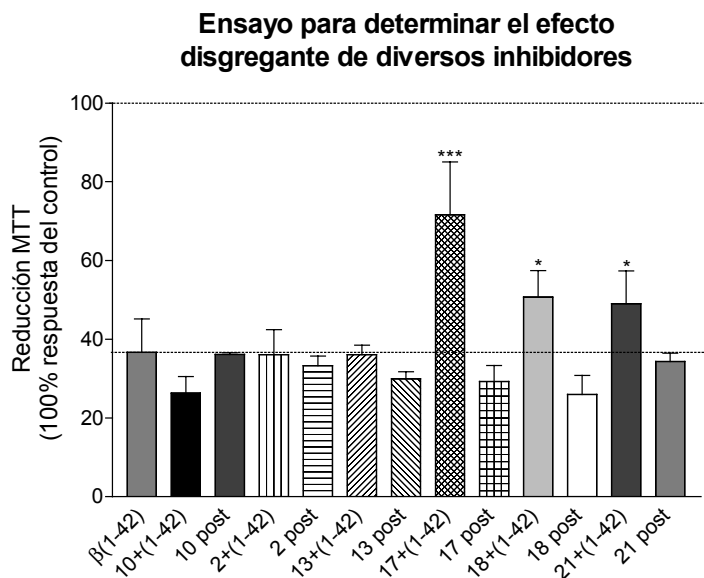
Un experimento típico que se realiza con los posibles inhibidores de la proteína A $\beta$  es determinar su capacidad de disociar fibras preformadas<sup>151</sup>. La ejecución de este ensayo se realiza con péptido A $\beta$  envejecido siguiendo el protocolo utilizado habitualmente (apartado 8.2.1.2), al que se le añade el inhibidor antes de aplicarlo a las células (apartado 8.4.2.6).

---

<sup>151</sup> Poduslo, J. F.; Curran, G. L.; Kumar, A.; Frangione, B.; Soto, C. J. *Neurobiol.* **1999**, 39, 371-382.

## 4 Evaluación de los N-metilinhibidores

En la Figura 63 se muestran los resultados obtenidos para este tipo de ensayo comparándolos con los valores que se obtienen mediante la preparación *habitual* de esta tesis (apartado 8.2.1.1.2).



**Figura 63.** Ensayo de inhibición de la toxicidad *a posteriori*. La concentración de A $\beta$  utilizada es 1  $\mu$ M, mientras que los inhibidores se encuentran a 5  $\mu$ M, tanto en las preparaciones convencionales (péptido-(1-42)), como al añadir el inhibidor sobre las fibras preformadas (péptido-post).

El análisis estadístico (ANOVA de un factor acompañado por un post-test Tukey) muestra que únicamente dan una respuesta que se diferencia de forma significativa de A $\beta$  los péptidos **17**, **18** y **21** mezclados con A $\beta$  antes de la disolución de la mezcla<sup>♦</sup>.

Este resultado nos indica que los compuestos ensayados no son capaces de reducir la toxicidad de A $\beta$  de forma significativa si se mezclan con fibras preformadas y se aplican posteriormente a células PC12.

### 4.1.3.2.4 Curva dosis-respuesta de diversas mezclas péptido-A $\beta$

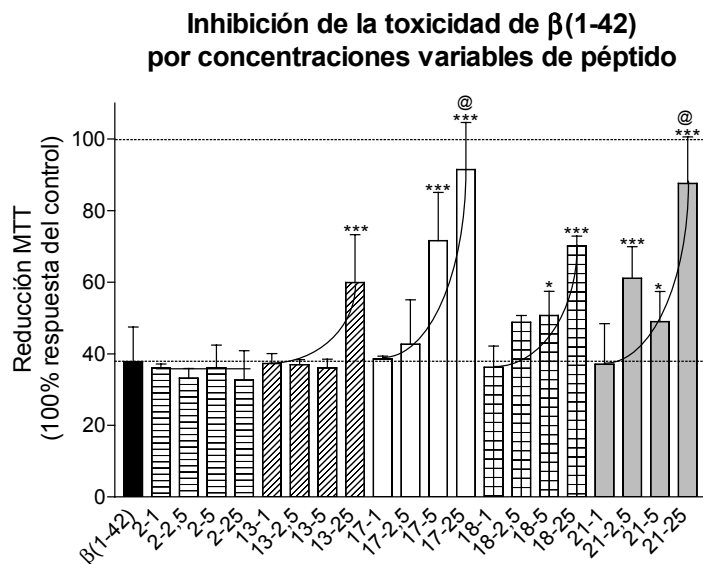
El perfil dosis-respuesta de un compuesto con actividad biológica es un parámetro importante, ya que nos permite ver cual es la concentración a partir de la que se observa un efecto significativo, además de otros parámetros. En este ensayo procedimos a determinar el efecto de los inhibidores escogidos anteriormente (exceptuando **10**, que se

<sup>♦</sup> En este caso **17** y **18** dan valores estadísticamente significativos ya que el valor promedio de A $\beta$  obtenido en este experimento es ligeramente inferior al obtenido en ensayos anteriores.

decidió no introducirlo en este ensayo al no presentar actividad en ninguno de los ensayos realizados en el SCT).

Se escogieron las relaciones molares A $\beta$ :inhibidor 1:1, 1:2,5, 1:5 y 1:25 para la realización de este ensayo. La preparación de las muestras se realizó como se describe en el apartado 8.2.1.1.2, añadiendo los equivalentes necesarios en cada caso. El resultado obtenido se muestra en la Figura 64.

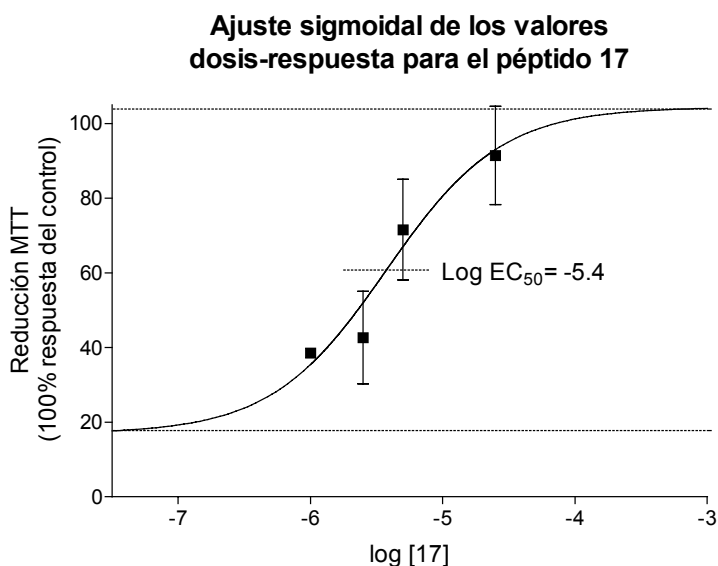
Este resultado muestra nuevamente que el péptido **2** no presenta actividad biológica en este sistema, ni aun utilizando 25 equivalentes. Por otro lado se observa que **13**, que había sido escogido por no dar una respuesta significativa al utilizar 5 equivalentes respecto a A $\beta$ , sí que da una respuesta significativa al emplear un exceso mayor (25 equivalentes). El péptido **21** muestra un aumento de la inhibición de la toxicidad con la dosis aplicada, llegándose a valores de supervivencia similares al 100% cuando se utilizan 25 equivalentes de péptido. Debido al comportamiento anómalo de la respuesta al utilizar 2,5 y 5 equivalentes de **21**, no es posible ajustar de forma adecuada este comportamiento a un gráfico dosis-respuesta sigmoide, aunque de forma aproximada podríamos decir que las tendencias mostradas por el péptido **17** y el péptido **21** son bastante similares.



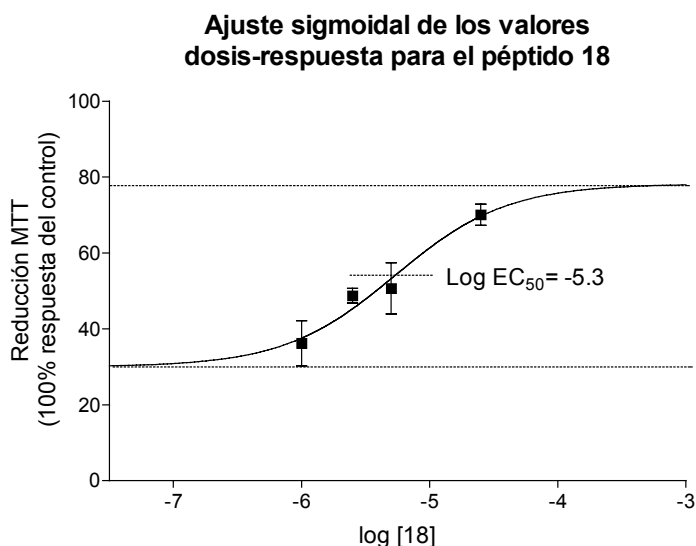
**Figura 64.** Efecto en células PC12 de A $\beta$  1  $\mu$ M en presencia de concentraciones variables de inhibidor (las leyendas indican péptido-concentración en  $\mu$ M). Se indican con \*\*\* los valores que difieren de forma significativa respecto a la respuesta de A $\beta$  (> 99,9% probabilidad), \* > 95% probabilidad, mientras que @ indica aquellos valores que no son estadísticamente diferentes del valor control correspondiente al 100% de supervivencia (< 95% probabilidad que sean diferentes). Las curvas simplemente remarcan la tendencia ascendente de los valores, sin corresponderse con ningún modelo teórico.

#### 4 Evaluación de los N-metilinhibidores

En el caso de los péptidos **17** y **18**, además de observarse un aumento de la supervivencia celular al incrementar la dosis de inhibidor, los datos obtenidos son coherentes y parecen estar lo suficientemente bien distribuidos como para poder ajustarlos de forma aproximada a una curva dosis-respuesta de tipo sigmoideal, como se observa en la Figura 65 y la Figura 66.



**Figura 65.** Ajuste de los valores obtenidos para el péptido **17** a una curva dosis-respuesta. El valor de  $r^2$  obtenido para este ajuste es 0,9912.



**Figura 66.** Ajuste de los valores obtenidos para el péptido **18** a una curva dosis-respuesta. El valor de  $r^2$  obtenido para este ajuste es 0,9973.

Hay que notar que para ajustar resultados experimentales a una curva sigmoideal es necesario un mínimo de 4 valores, mejorándose notablemente el ajuste al aumentar dicho número y siendo necesario que dichos valores estén distribuidos de forma adecuada (si



obtenemos 3 valores correspondientes a una de las mesetas no se puede definir correctamente la curva sigmoideal, como sucede en el caso del compuesto **13**).

Debido al reducido número de puntos experimentales, las curvas extrapoladas en la Figura 65 y la Figura 66 sólo pretenden mostrar la tendencia en el comportamiento de ambos inhibidores, siendo meramente orientativos los valores mostrados.

Si el ajuste de las curvas concentración-respuesta a los datos experimentales de los compuestos **17** y **18** fuese correcto podríamos decir que ambos péptidos presentan una concentración efectiva 50 ( $EC_{50}$ ) similar (del orden de 5  $\mu$ M), pero **17** resulta mucho más potente puesto que consigue una mayor reducción de la toxicidad de  $A\beta$ .

Un análisis objetivo de los gráficos expuestos anteriormente nos lleva a pensar que sería necesaria la realización de experimentos adicionales, utilizando valores más extremos, para reducir el error producido en la estimación de las mesetas (ninguno de los puntos forma parte de éstas, y además en el caso de **17** se obtiene un valor inferior menor que el observado para el péptido  $A\beta$  solo).

### 4.1.3.3 Discusión de los resultados biológicos obtenidos

En la Tabla 11 se muestra un resumen de los péptidos que han mostrado actividad en alguno de los ensayos realizado, indicando el laboratorio donde se realizaron.

El hecho de observar que ninguno de los péptidos ensayados en el IIBB dan una actividad apreciable al realizar nuevamente el ensayo en el SCT está relacionado probablemente con la mayor sensibilidad al compuesto  $A\beta$  que presenta esta cepa de células PC12. La mayor sensibilidad a  $A\beta$  podría explicar el hecho de que necesitemos inhibidores más potentes para obtener una disminución de la toxicidad de  $A\beta$ .

#### 4 Evaluación de los N-metilinhibidores

Péptido	Laboratorio	Grado de significación <sup>♦</sup>	
		1 $\mu$ M A $\beta$	2 $\mu$ M A $\beta$
<b>2</b>	IIBB	**	**
	SCT	No significativo	
<b>3</b>	IIBB	*	No significativo
<b>10</b>	IIBB	** <sup>o</sup>	
	SCT	No significativo	---
<b>17</b>	SCT	***	---
<b>18</b>	SCT	* (test t-Student)	---
<b>21</b>	SCT	* (test t-Student)	---

**Tabla 11.** Resumen de inhibidores que han mostrado actividad biológica en alguno de los ensayos realizados usando 5 equivalentes de exceso respecto A $\beta$ .

Destaca el hecho de que los únicos inhibidores que mostraron actividad biológica en el SCT fueron algunos de los compuestos construidos con D-aminoácidos, es decir, moléculas mucho más resistentes a la proteólisis (**13**, **17**, **18** y **21** están constituidos por D-aminoácidos), pero el ensayo de degradación llevado a cabo posteriormente (apartado 5.4.1.3) muestra que el medio de cultivo RPMI+ no solo no parece tener más proteasas, sino que es incluso menos activo que el medio DMEM+ utilizado en el IIBB. Esta observación hace descartar la hipótesis de que el cambio de comportamiento se debe a una mayor degradación de los péptidos en el medio de cultivo utilizado en el SCT.

<sup>♦</sup> Los resultados en el SCT son únicamente a 1  $\mu$ M de A $\beta$ .

### 4.2 Estudios de microscopía electrónica de transmisión de A $\beta$ en presencia de los inhibidores

Paralelamente a la realización de los ensayos biológicos se estudió el efecto de los inhibidores sobre la capacidad de formación de fibras amiloides por parte de A $\beta$  mediante microscopía electrónica de transmisión con tinción negativa. Esta técnica se utiliza ampliamente como herramienta para comprobar la naturaleza amiloide de distintos tipos de agregados, como se ha comentado anteriormente.

La microscopía electrónica de transmisión, TEM, es un tipo de microscopía que permite observar estructuras con un tamaño igual o superior a 5-10 nm, dependiendo de la preparación de muestra utilizada<sup>152</sup>. Esta técnica por tanto permite observar fibras amiloides, cuyo diámetro es del orden de los 8 nm.

Las muestras de TEM se depositan normalmente sobre una rejilla metálica (puede ser de cobre, níquel, oro, etc.), que suele estar recubierta de un polímero, como es el formvar. En el caso de muestras biológicas, éstas son transparentes al paso de electrones, por lo que no pueden analizarse directamente. Una de las técnicas más utilizadas para hacer visibles estas muestras es la tinción con una sustancia que absorba electrones, de forma que las estructuras presentes se vuelven observables, como se esquematiza en la Figura 67.

Un protocolo utilizado frecuentemente en el análisis de preparaciones amiloides mediante TEM consiste en utilizar rejillas de cobre y recubrir la muestra con acetato de uranilo, UO<sub>2</sub>·(AcO)<sub>2</sub>, mediante el proceso denominado tinción negativa. En este tipo de preparación, la muestra se adsorbe en primer lugar sobre la rejilla durante un periodo de tiempo y, una vez fijada la muestra sobre la rejilla, se procede a teñirla con una disolución de acetato de uranilo UO<sub>2</sub>·(AcO)<sub>2</sub> al 2%.

Tanto el tiempo de deposición de la muestra como el de tinción han de ser optimizados. Un tiempo muy breve puede ser la causa de que no se observen fibras al analizar la rejilla, mientras que un exceso de tiempo puede causar la deposición de

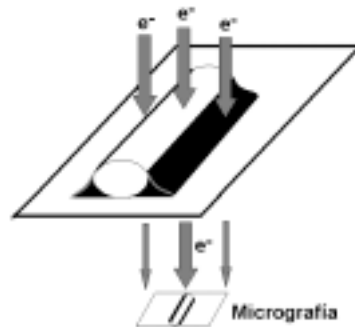
---

<sup>152</sup> Piqueras, J. R.; Megías L. M. *Manual de técnicas de microscopía electrónica (MET). Aplicaciones biológicas*, Granada **1981**.

## 4 Evaluación de los N-metilinhidroses

---

demasiada materia, dando lugar a la inestabilidad y posible ruptura de la preparación, e imposibilitando el análisis.



**Figura 67.** Esquema del proceso de tinción y posterior observación de la muestra utilizando TEM. El  $UO_2 \cdot (AcO)_2$  se deposita alrededor de la fibra, dando lugar a una zona opaca a los electrones. La medida de la radiación que atraviesa la muestra da lugar a la micrografía.

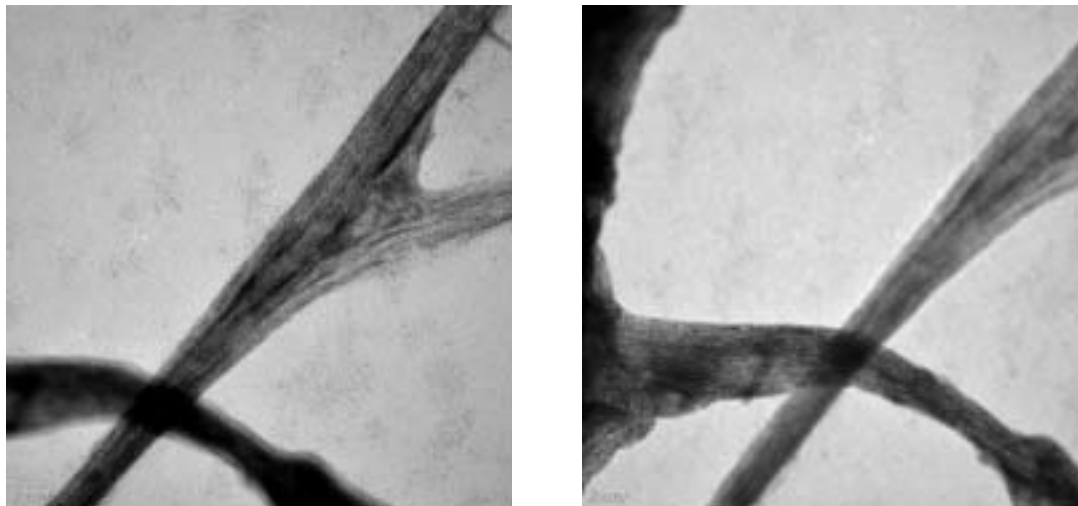
### 4.2.1 Algunas limitaciones de la técnica de TEM

El uso de TEM permite determinar de forma sencilla si una muestra presenta agregados de tipo amiloide o no. Una de las limitaciones que presenta es que los datos obtenidos muy difícilmente pueden considerarse cuantitativos. La deposición de fibras o de agregados amorfos sobre la rejilla se basa en un proceso de afinidad (la rejilla tiene una naturaleza hidrófoba, debido a su recubrimiento polimérico, lo que facilita la deposición de fibras sobre ella), por lo que este proceso puede no estar igual de favorecido para todas las estructuras y depende del tiempo utilizado. Una mayor presencia de una determinada estructura no implica necesariamente que ésta sea la especie más abundante en la muestra.

Otro problema que presenta la cuantificación utilizando TEM es la tinción desigual que muestran los diferentes tipos de estructuras analizadas. Mientras que las fibras pequeñas se observan frecuentemente de forma difusa, lo que dificulta tanto la determinación de su tamaño, como su localización (en ocasiones sólo se intuye su existencia, como es el caso de las fibras mostradas en la Figura 89), los haces de fibras y las estructuras amorfas presentan una intensa tinción, pudiendo esconder en su estructura pequeñas fibras unidas o depositadas con ellas.

No sólo resultan difíciles de cuantificar las estructuras de menor tamaño: la obtención de imágenes bidimensionales de los haces de fibras no permite determinar la cantidad de materia que contienen. Las micrografías son imágenes en 2D de estructuras

tridimensionales, como se aprecia en la Figura 68. El hecho de tener dos haces de fibras en planos focales diferentes indica que poseen un cierto grosor y, por tanto, un volumen que no se puede cuantificar mediante TEM.



**Figura 68.** Micrográficas de  $\beta(1-42)$ . Muestra dos haces de fibras que se superponen en el espacio. La barra corresponde a 20 nm en ambos casos.

Por consiguiente, en esta tesis sólo se ha utilizado la microscopía electrónica de transmisión como prueba cualitativa de la capacidad de  $A\beta$  de formar o no fibras amiloides en presencia de los distintos inhibidores ensayados.

### 4.2.2 Optimización del proceso de tinción

El protocolo utilizado anteriormente en nuestro laboratorio para la preparación de muestras y posterior análisis mediante TEM<sup>153</sup> indicaba tiempos de aplicación de la muestra y de tinción variables, dando un amplio intervalo para ambos (entre 1 y 5 min para la deposición y de 0,5 a 2 min para la tinción). Una prueba preliminar mostró la necesidad de acotar estos valores para poder obtener resultados reproducibles en las medidas de microscopía, y reducir los problemas de estabilidad observados en algunas preparaciones.

Se prepararon muestras a los tiempos de deposición y tinción indicados en la Tabla 12 (inicialmente se fijó el tiempo de tinción y se optimizó el tiempo de deposición, y después se hizo al revés, utilizando el valor óptimo obtenido para el tiempo de

<sup>153</sup> Quintero, M. R.; *Máster experimental en Química Orgánica*, Dpto. Química Orgánica, Universidad de Barcelona (septiembre 1999).

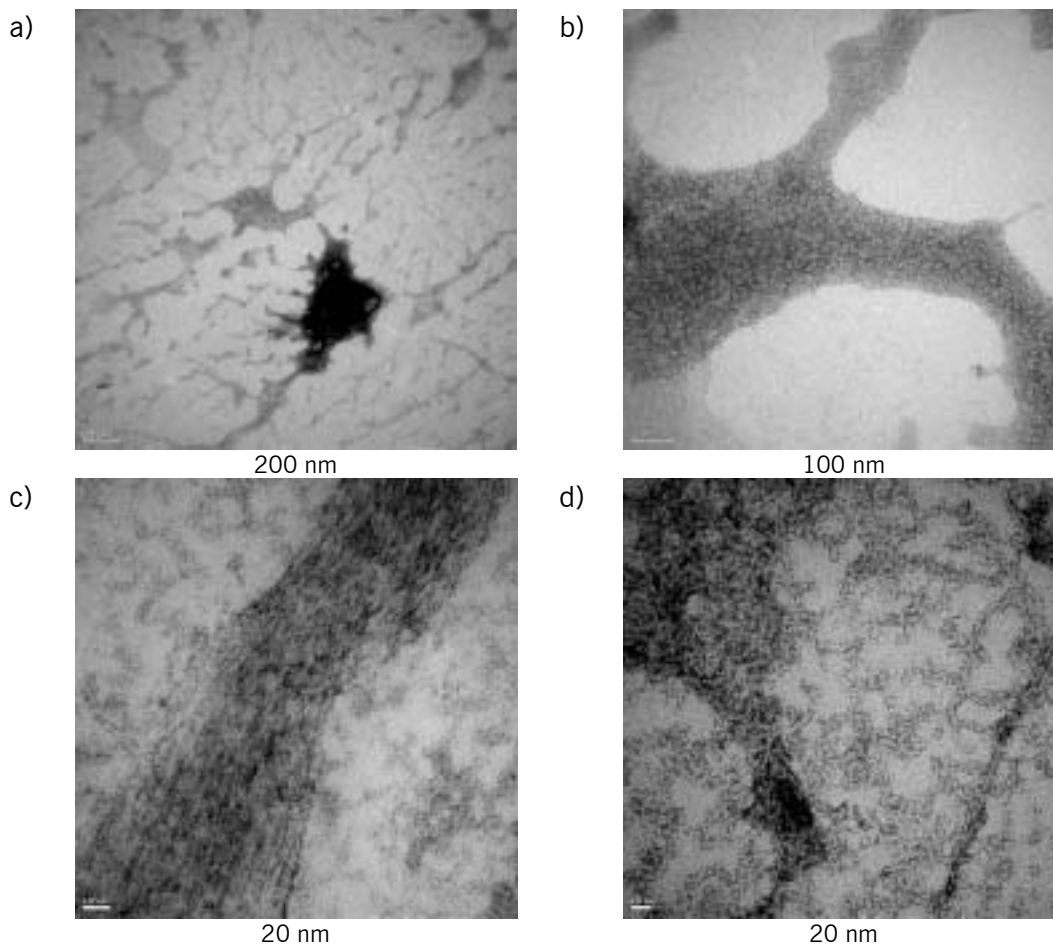
#### 4 Evaluación de los N-metilinhidores

deposición). Además se utilizaron rejillas con recubrimiento de  $C_{\text{grafito}}$  ♦ para mejorar la estabilidad de las preparaciones.

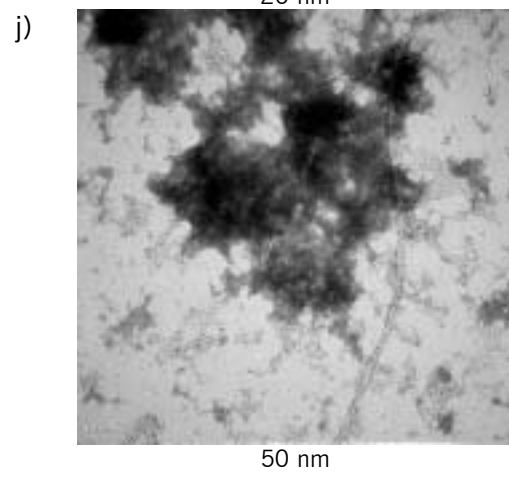
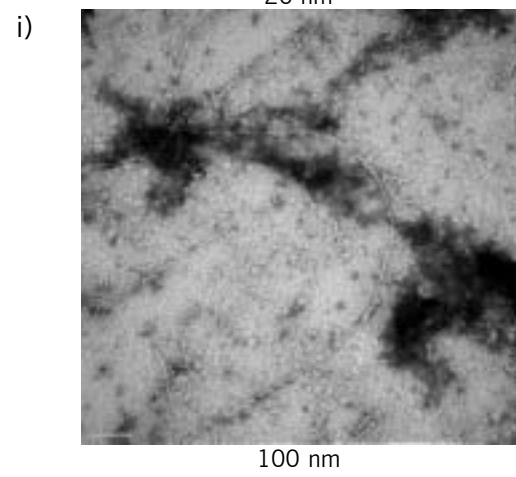
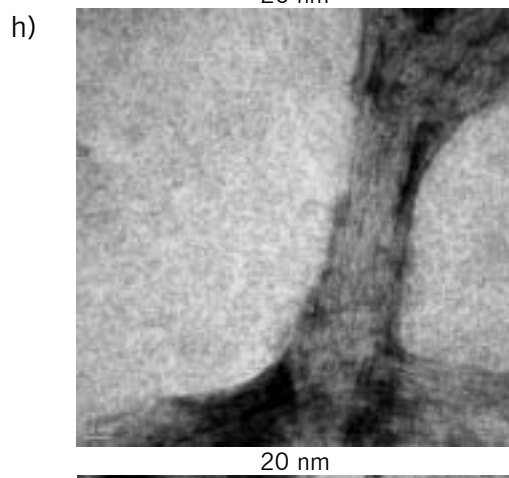
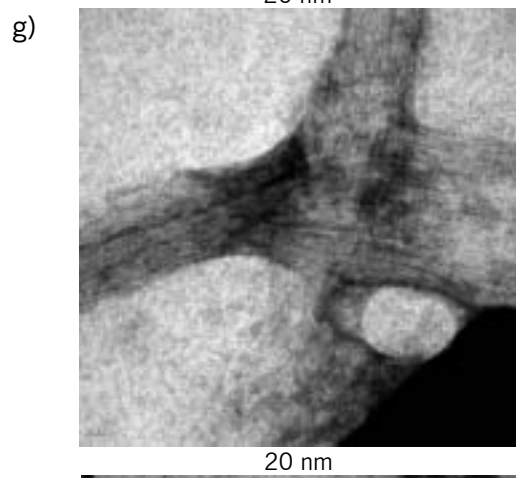
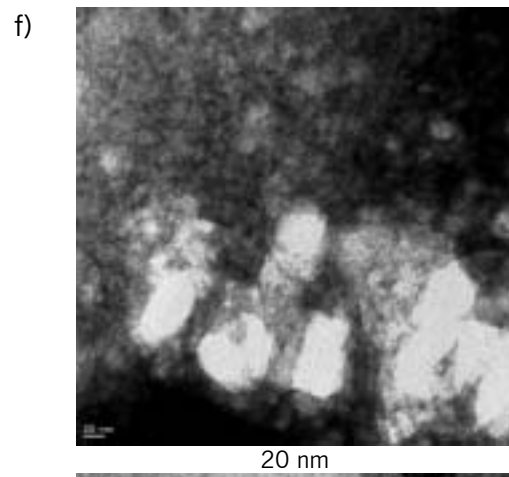
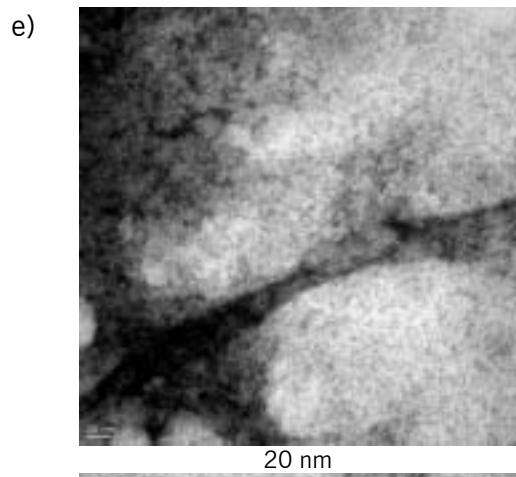
Muestra $\beta(1-42)$	Tiempo deposición	Tiempo tinción
A	1 min	30 s
B	2 min	30 s
C	5 min	30 s
D	2 min	1 min

**Tabla 12.** Muestras de  $\beta(1-42)$  utilizadas para determinar los parámetros óptimos de preparación de muestras para TEM

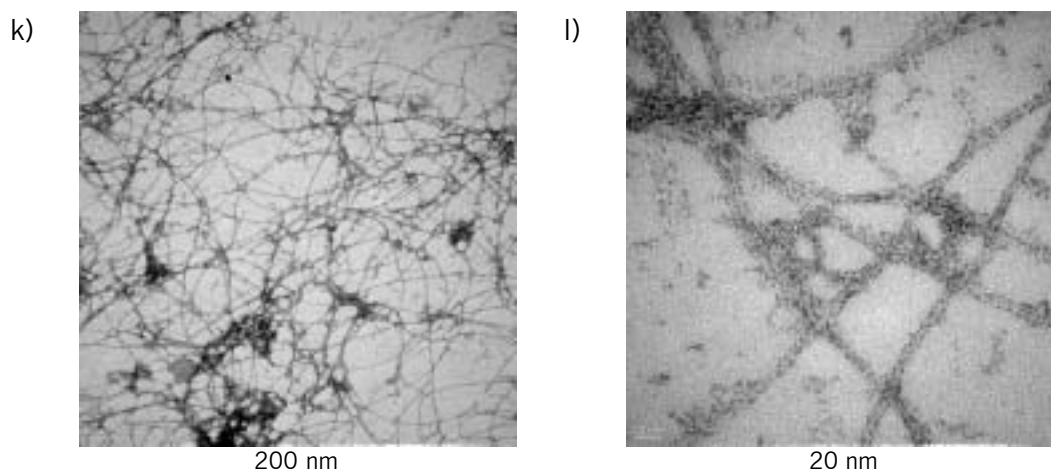
En las figuras siguientes se muestran algunos de los resultados de TEM obtenidos para las diferentes preparaciones.



♦ Una forma de aumentar la estabilidad de las rejillas utilizadas en TEM es recubrirlas con  $C_{\text{grafito}}$  antes de la aplicación de la muestra. El inconveniente de este tratamiento es que se produce una pequeña pérdida de contraste.



#### 4 Evaluación de los N-metilinhidores



**Figura 69.** Las micrografías a) y b) corresponden a la preparación de muestra A; c) y d) a la preparación B; e), f), g) y h) a la preparación C; e i), j), k) y l) a la preparación D. Bajo cada imagen se indica la escala a la que corresponde la barra. Todas las micrografías, exceptuando las correspondientes a la muestra D, se hicieron utilizando una muestra de  $\beta(1-42)$  suspendida en agua ( $\sim 250 \mu\text{M}$ ) y envejecida a temperatura ambiente durante 1 día. Las micrografías D se hicieron con una muestra de  $\beta(1-42)$  preparada de la forma habitual (apartado 8.2.1.2.3).

Al evaluar los resultados obtenidos a diferentes tiempos de deposición de muestra podemos ver que para valores de 1 min no fue posible detectar la presencia de fibras (tanto la figura a) como b) muestran sólo estructuras amorfas de tamaño elevado). Esto parece indicar que, con un tiempo tan breve, el grado de deposición de fibras amiloides es muy bajo, por lo que resulta complicado detectar su presencia<sup>♦</sup>.

Tanto con 2 como con 5 minutos de deposición fue posible detectar fibras amiloides, tanto aisladas como en forma de haces fibrilares, lo que corrobora el hecho de que utilizando sólo 1 min las fibras no se depositan de forma adecuada. La mayor diferencia observada entre ambas muestras es la estabilidad: la preparación en la que se deposita la muestra durante 5 min tiene una mayor acumulación de material (rejillas más pobladas), lo que se traduce en una mayor sensibilidad al haz de electrones: en la Figura 69 f) se puede apreciar cómo una región saturada de materia orgánica empieza a resquebrajarse debido al calentamiento producido por el haz de electrones).

El experimento D, realizado utilizando el tiempo de deposición óptimo (2 min) y un tiempo de tinción mayor (1 min en lugar de 30 s) muestra que en estas condiciones se obtienen resultados similares a los observados con la preparación B, aunque con un poco más de contraste. El inconveniente es, nuevamente, que en las regiones con

---

<sup>♦</sup> El reducido tamaño de las fibras amiloides en comparación con la rejilla dificulta el análisis exhaustivo de ésta, por lo que si tenemos una concentración baja de fibras aisladas es poco probable localizarlas.



acumulaciones de materia importantes la muestra se vuelve más inestable frente a la radiación, por lo que no se puede analizar adecuadamente.

La preparación óptima se estableció, por tanto, en 2 min de deposición de muestra y 30 s de tinción. Con estos parámetros se combina una tinción adecuada con una mayor estabilidad en aquellas regiones pobladas con estructuras de tamaño elevado.

### 4.2.3 Análisis de las muestras A $\beta$ -inhibidor utilizando TEM

Las muestras utilizadas en los ensayos biológicos fueron analizadas de forma sistemática utilizando TEM. La deposición y teñido de dichas muestras se realizó según el protocolo del apartado 8.5.1.3 (debido a ello las preparaciones analizadas en este apartado fueron incubadas durante ~93 h a 37°C y permanecieron después entre 5 y 24 h a temperatura ambiente).

La primera serie de micrografías mostrada en la Figura 70 corresponde al péptido A $\beta$  solo, el cual fue utilizado como control, tanto en los ensayos biológicos, como en los de TEM\*. Esta colección de imágenes es una parte representativa de las diversas estructuras con aparente orden observadas durante la realización de esta tesis. Se han omitido muchas imágenes por su similitud con las mostradas, y otras debido a su naturaleza dudosa o artefactual. La representación de estructuras amorfas en estas imágenes es pequeña, debido tanto a su baja aparición en estas preparaciones como a la dificultad de registrarlas (las estructuras amorfas más compactas suelen presentar un exceso de tinción, por lo que es difícil observarlas sin producir inestabilidad en la muestra).

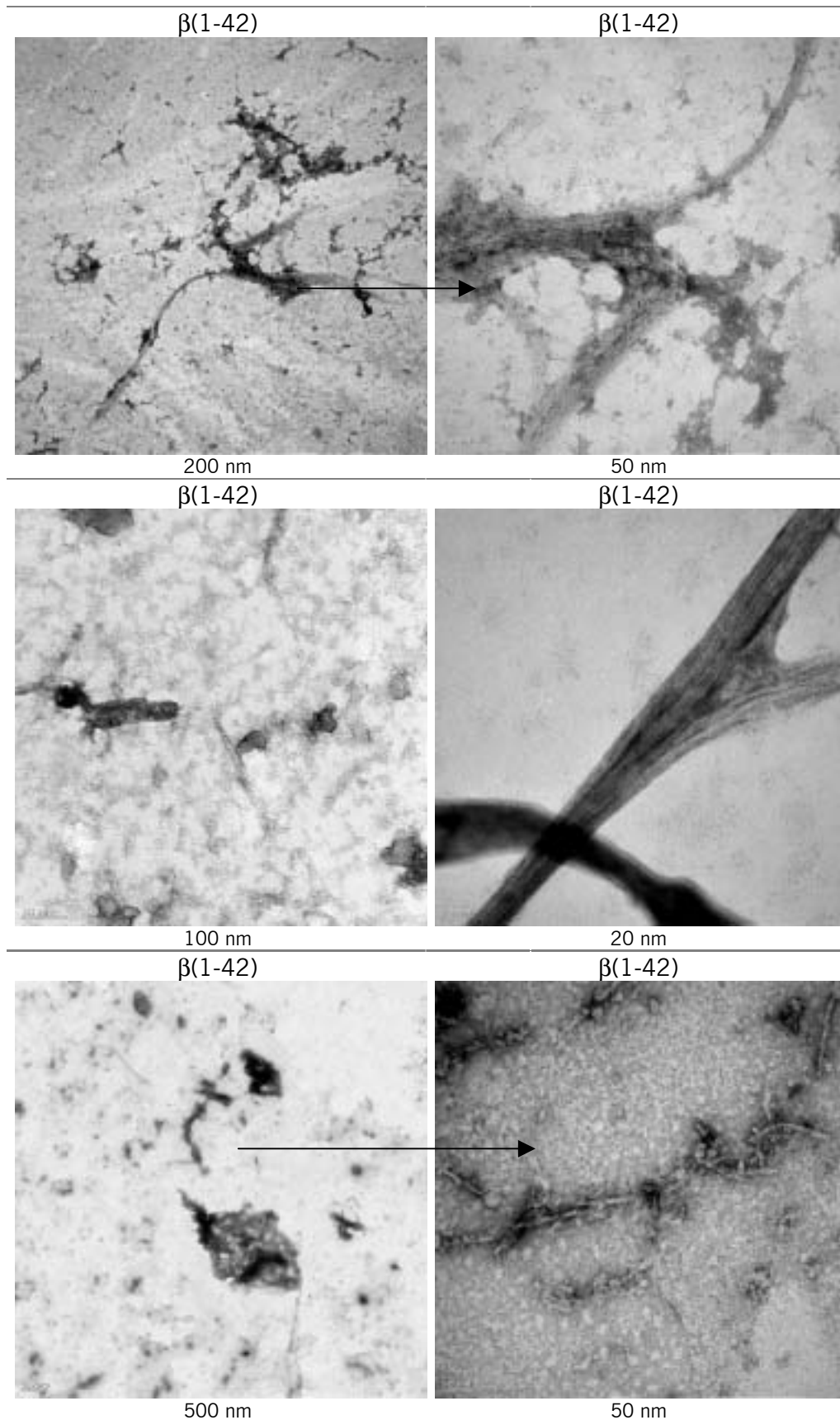
Otro problema que se ha encontrado es la incertidumbre que se produce a veces en el proceso de clasificación de algunas estructuras (en el caso de A $\beta$  más el inhibidor **4** mostrado en la Figura 74 se ve un ejemplo: de lejos el aglomerado de materia parece amorfo, pero a más aumentos se discierne la estructura fibrilar; desafortunadamente, no siempre es posible encontrar regiones que permitan esclarecer la naturaleza del agregado).

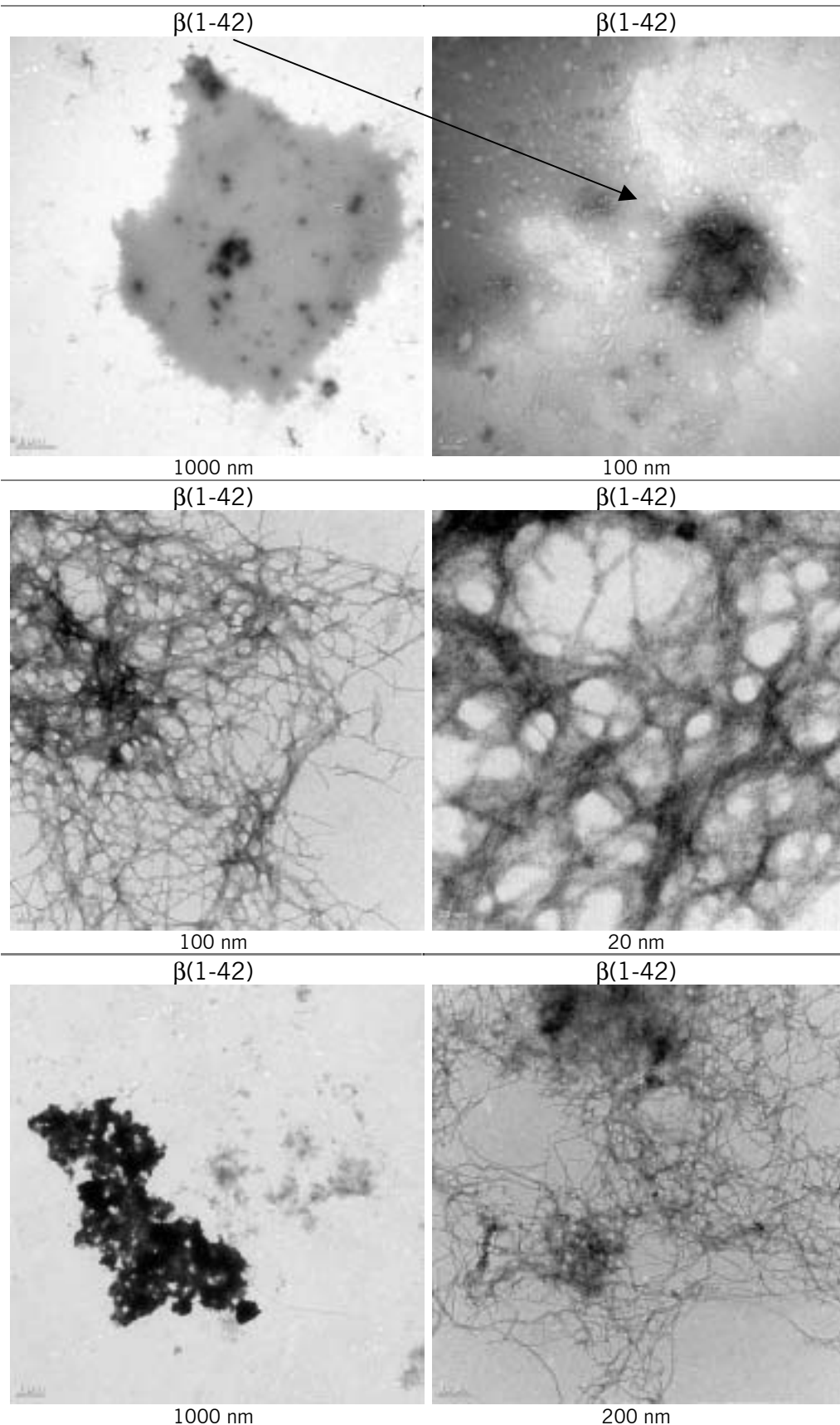
---

\* La ausencia de fibras amiloides en la muestra de A $\beta$  puede indicar problemas durante el envejecimiento del péptido o en el proceso de deposición y teñido.

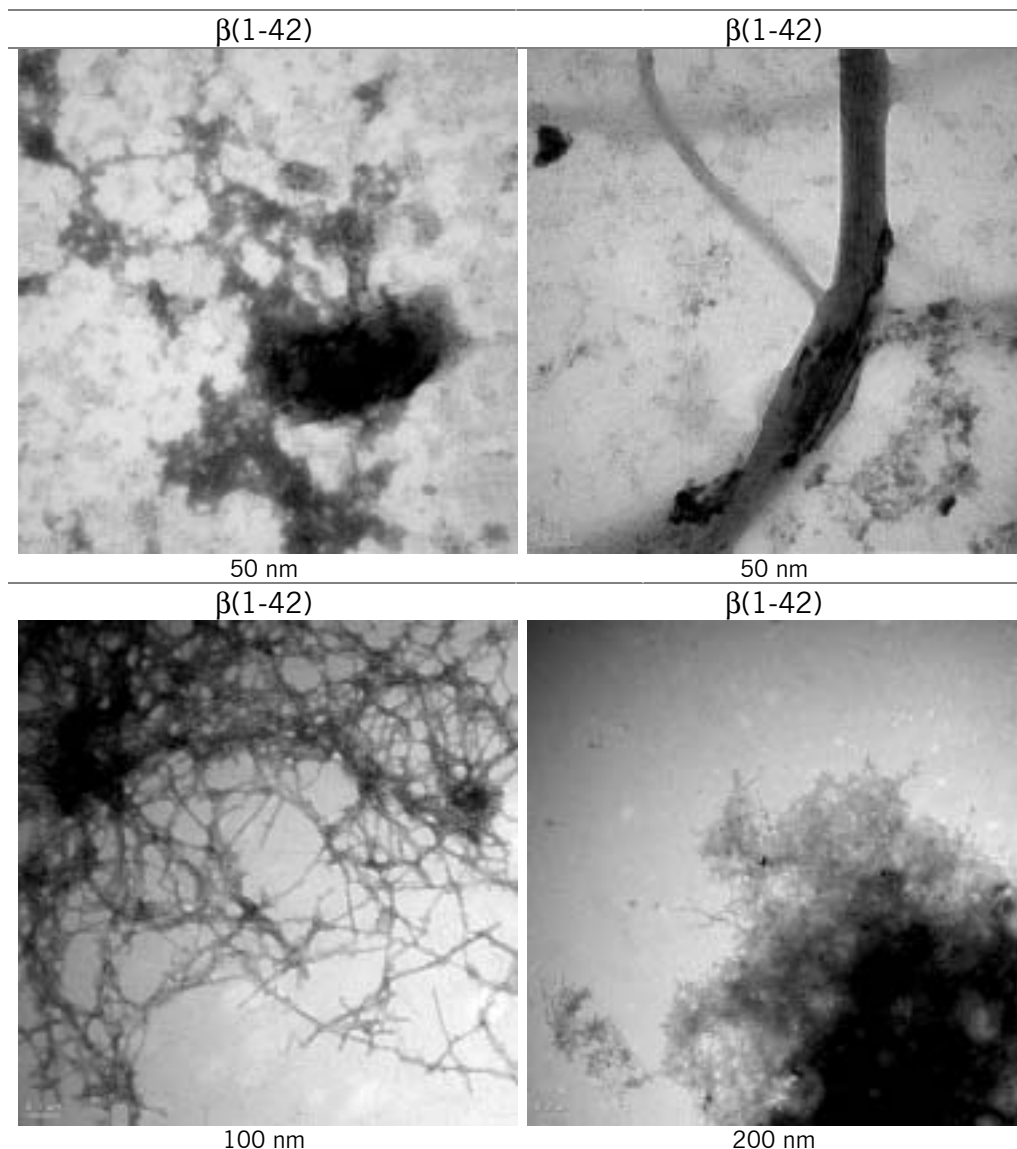
#### 4 Evaluación de los N-metilinhidores

---





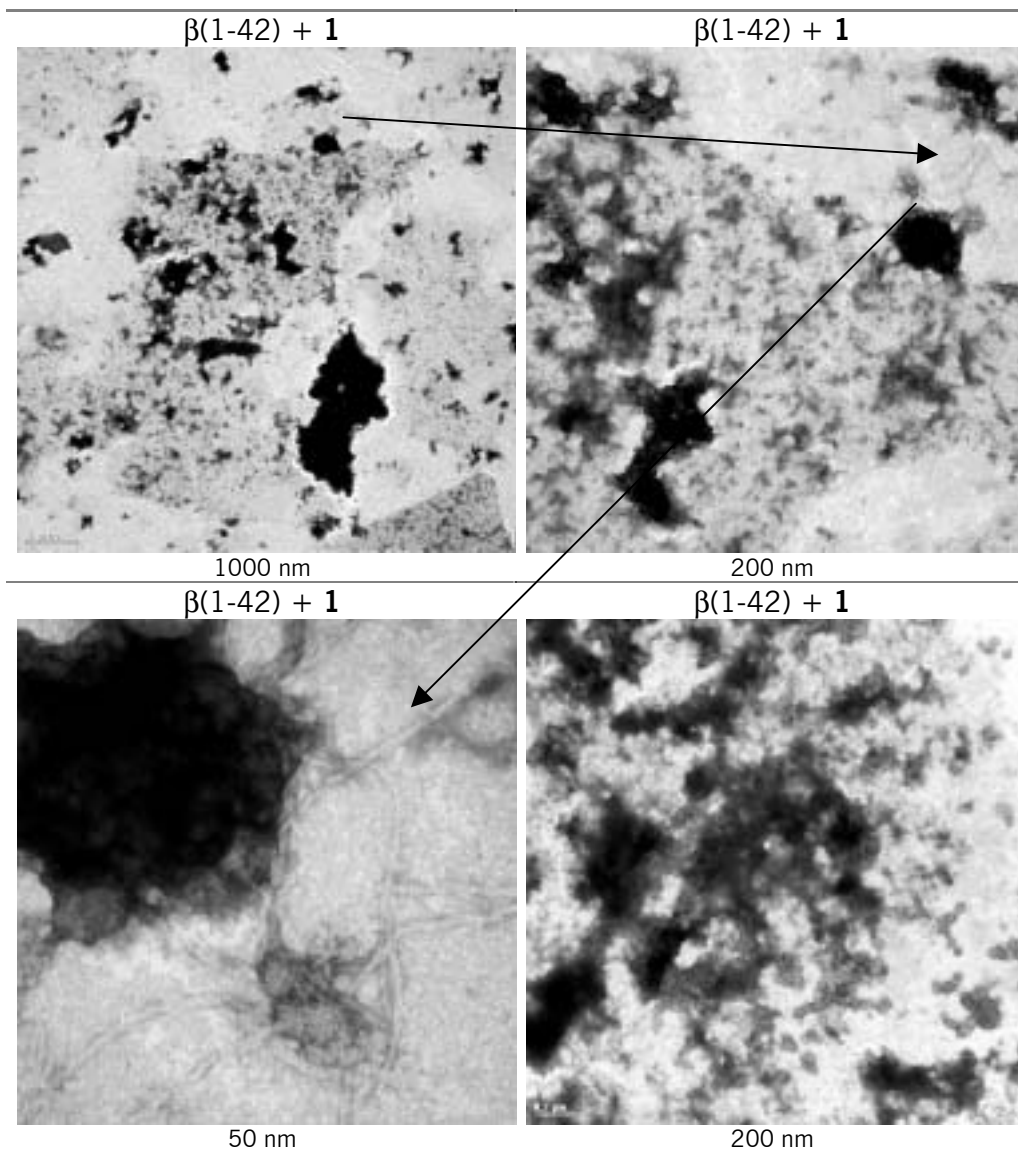
#### 4 Evaluación de los N-metilinhibidores



**Figura 70.** Micrografías de  $\beta(1-42)$  utilizado en los ensayos biológicos y preparado como se describe en el apartado 8.2.1.2.3. Bajo cada figura se indica la escala a la que corresponde la barra.

La Figura 69 y la Figura 70 muestran básicamente los tres tipos de estructuras fibrilares diferentes que han mostrado las preparaciones de  $A\beta$  en la presente tesis. Por un lado, se han observado fibras amiloides pequeñas, las cuales se encuentran dispuestas de formas diversas (entrecruzadas, aisladas totalmente o vinculadas a agregados amorfos). También se han detectado algunas estructuras que parecen constituidas por fibras amiloides densamente compactadas, sin orden aparente (se distinguen las fibras de los extremos, unidas a una masa oscura). Por último, un tipo de asociación que se ha observado con elevada frecuencia son los haces de fibras: son agregados que presentan la apariencia de ramas de árbol, con un ancho que oscila desde unas decenas de nanómetros hasta micras. La longitud de estos haces es del orden de varias micras y al observarlos con

aumentos elevados se puede distinguir una estructura interna estriada, causada por las fibras amiloides que los constituyen.

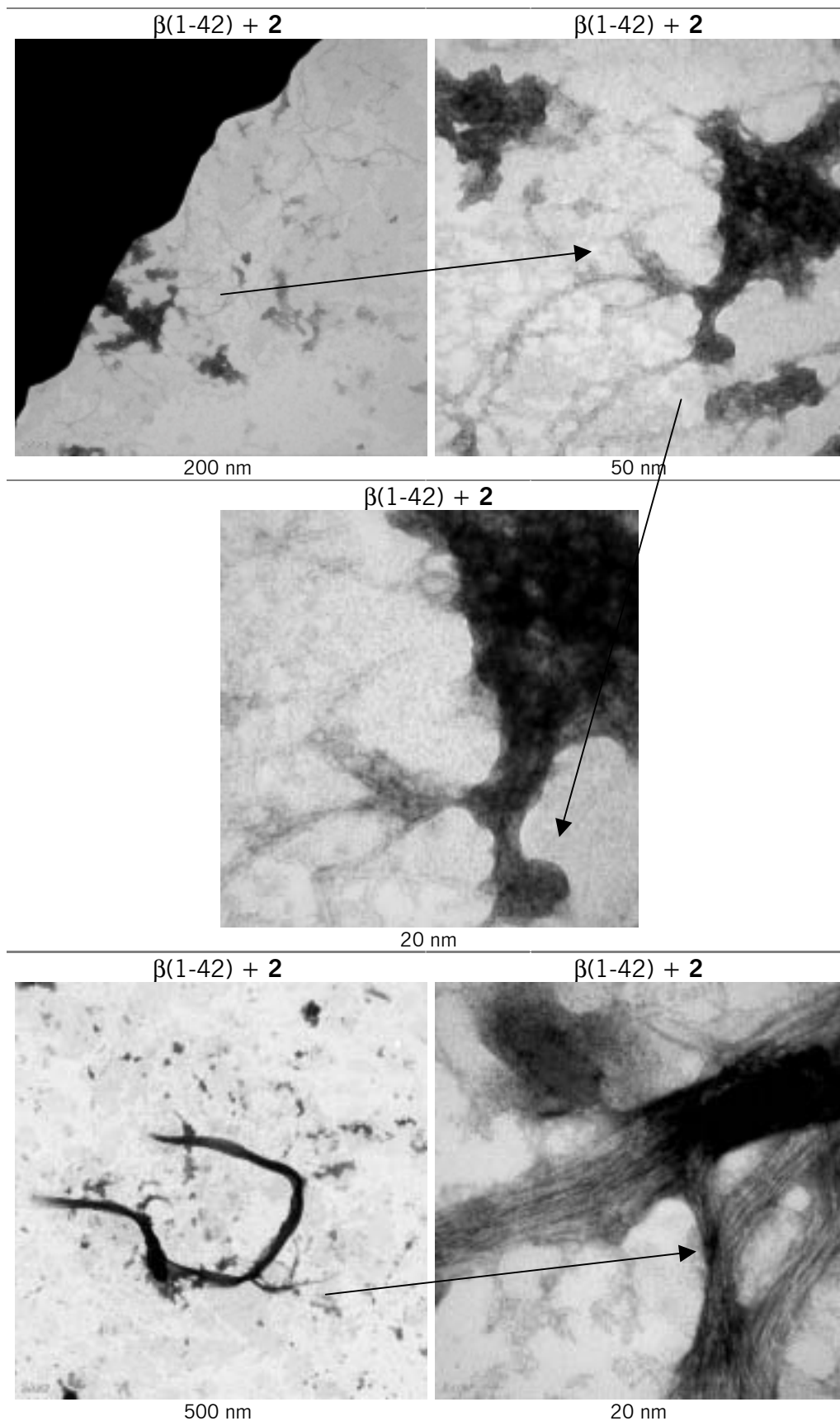


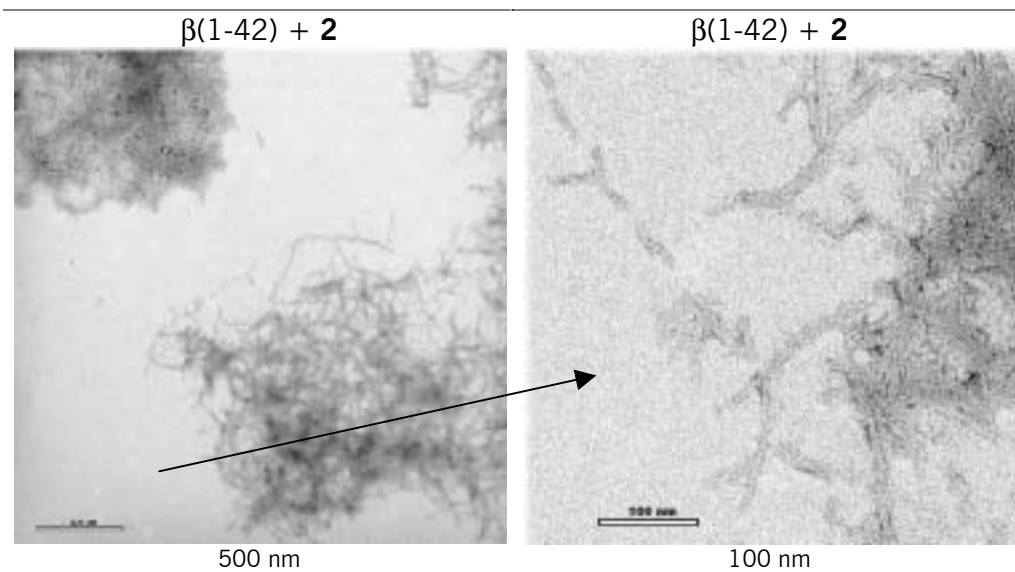
**Figura 71.** Micrografías de  $\beta(1-42)$  más el inhibidor **1**. Muestras utilizadas en los ensayos biológicos (apartado 4.1.3). Bajo cada figura se indica la escala a la que corresponde la barra.

Las mezclas de  $\beta(1-42)$  y **1**, además de contener fibras pequeñas que surgen y se entrecruzan con estructuras amorfas de apariencia difusa, también presentaron estructuras amorfas, como las mostradas en la Figura 71. Además, fue posible observar algunos haces fibrilares de tamaño elevado como los observados en las preparaciones de  $\beta(1-42)$  y **2**.

#### 4 Evaluación de los N-metilinhibidores

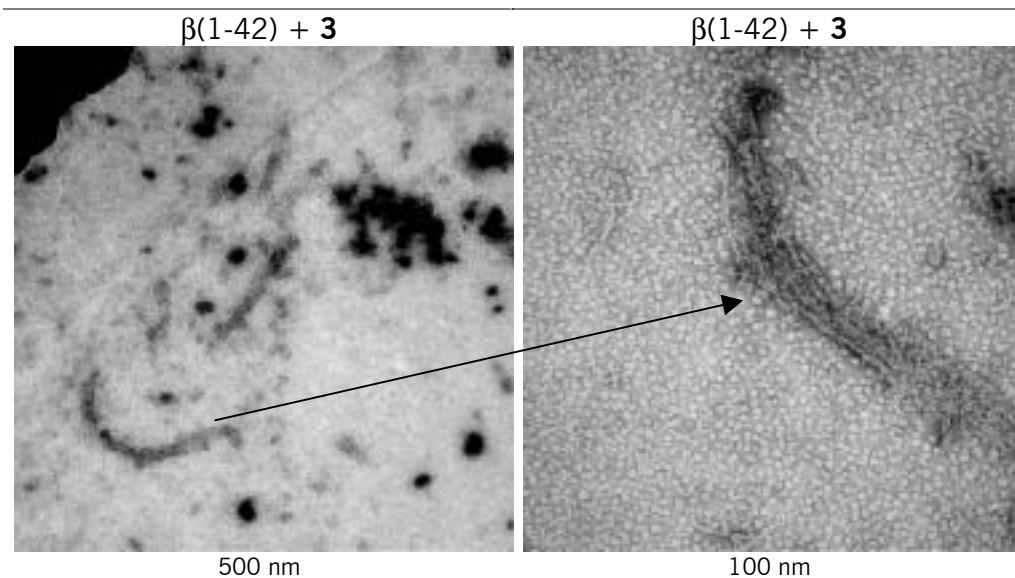
---





**Figura 72.** Micrografías de  $\beta(1-42)$  más el inhibidor **2**. Muestras utilizadas en los ensayos biológicos (apartado 4.1.3). Bajo cada figura se indica la escala a la que corresponde la barra.

El péptido **2**, a pesar de ser el mejor inhibidor en la primera serie de experimentos, tampoco fue capaz de evitar, en las condiciones de envejecimiento utilizadas, la formación de fibras amiloides, como se aprecia en la Figura 72. Así se detectó la presencia tanto de fibras pequeñas entrelazadas, como de haces de fibras y fibras unidas a estructuras compactas.



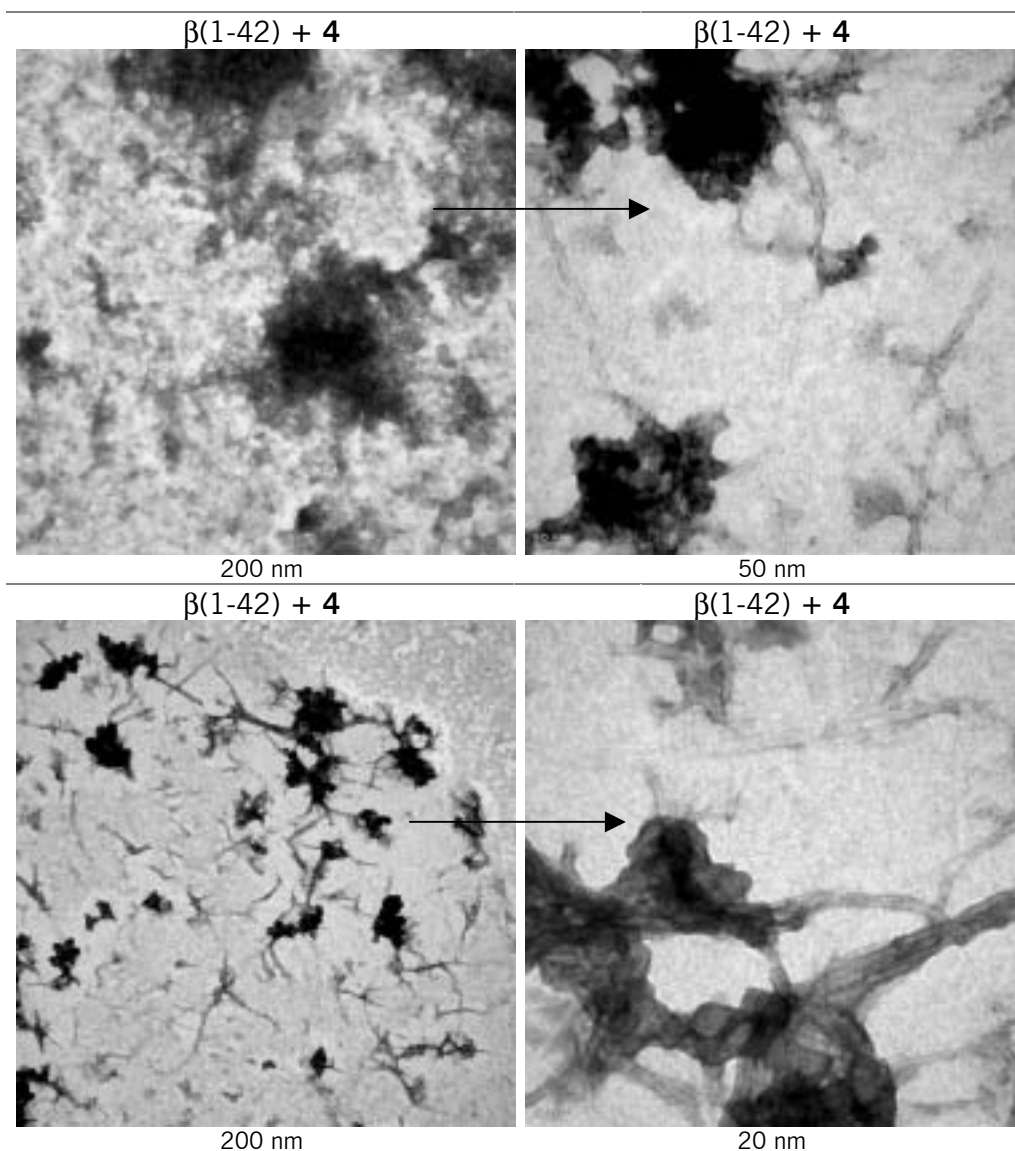
**Figura 73.** Micrografías de  $\beta(1-42)$  más el inhibidor **3**. Muestras utilizadas en los ensayos biológicos (apartado 4.1.3). Bajo cada figura se indica la escala a la que corresponde la barra.

#### 4 Evaluación de los N-metilinhibidores

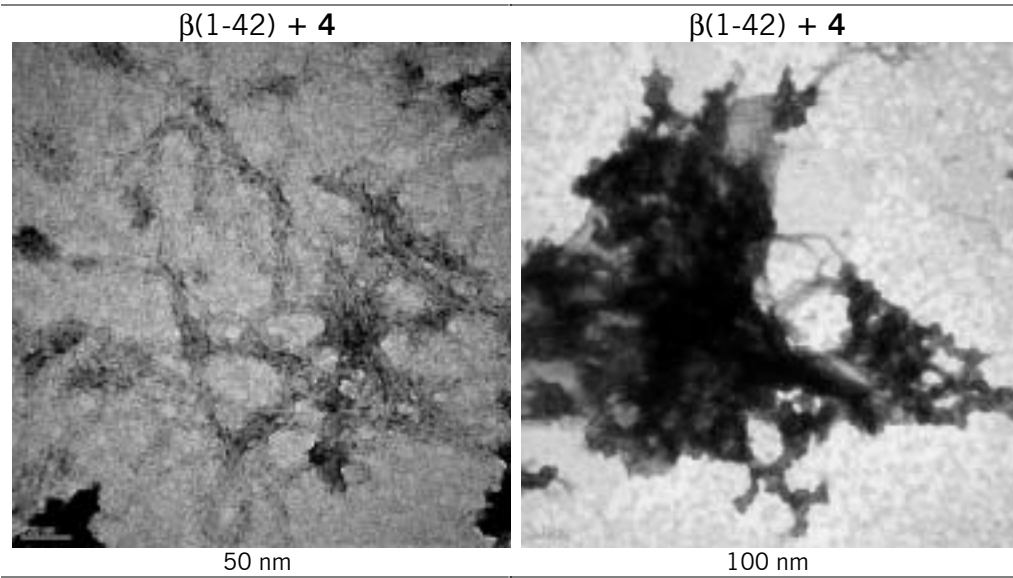
---

La mezcla de  $\beta(1-42)$  y **3** dio lugar a estructuras similares a las observadas en la mezcla de  $\beta(1-42)$  y **4** (fibras pequeñas formando nudos), además de las agrupaciones de fibras como las mostradas en la Figura 73.

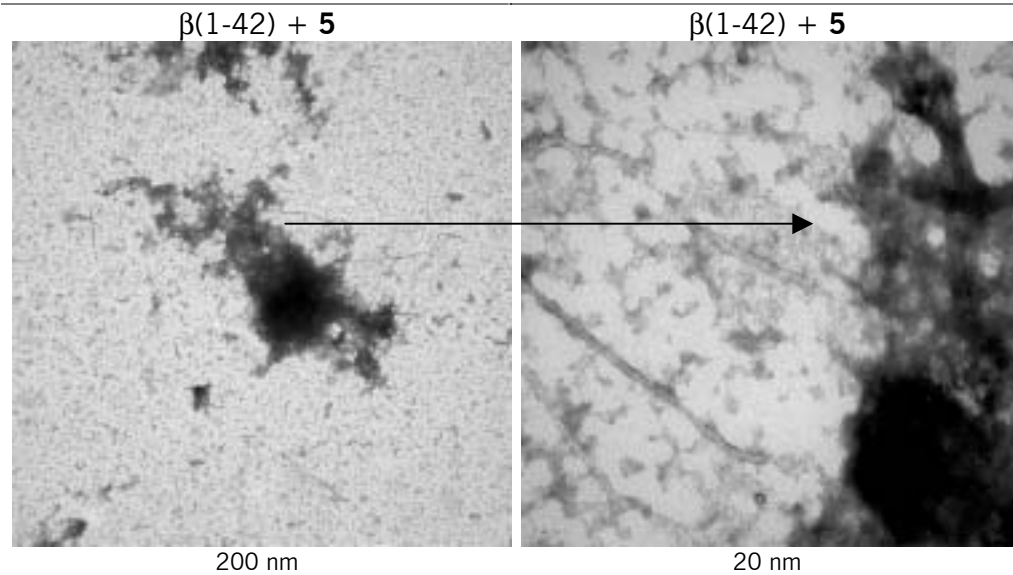
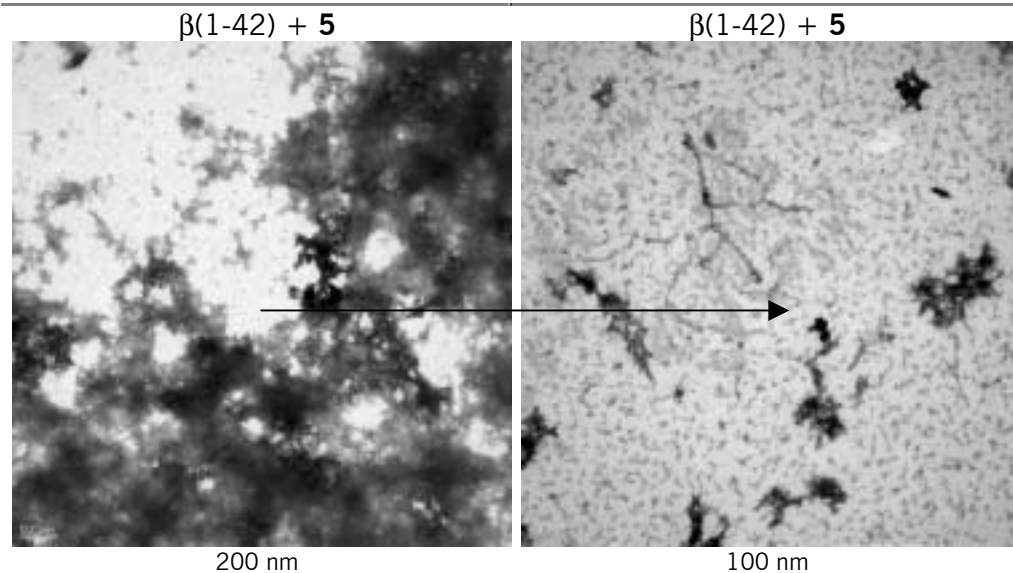
La Figura 74 muestra diversas micrografías correspondientes a distintas preparaciones de  $\beta(1-42)$  en presencia del péptido **4**. En ellas se observan fibras pequeñas entrelazadas, tanto entre ellas como con algunos agregados de apariencia amorfa. No se pudo detectar la presencia de ningún otro tipo de estructura ordenada en estas preparaciones.





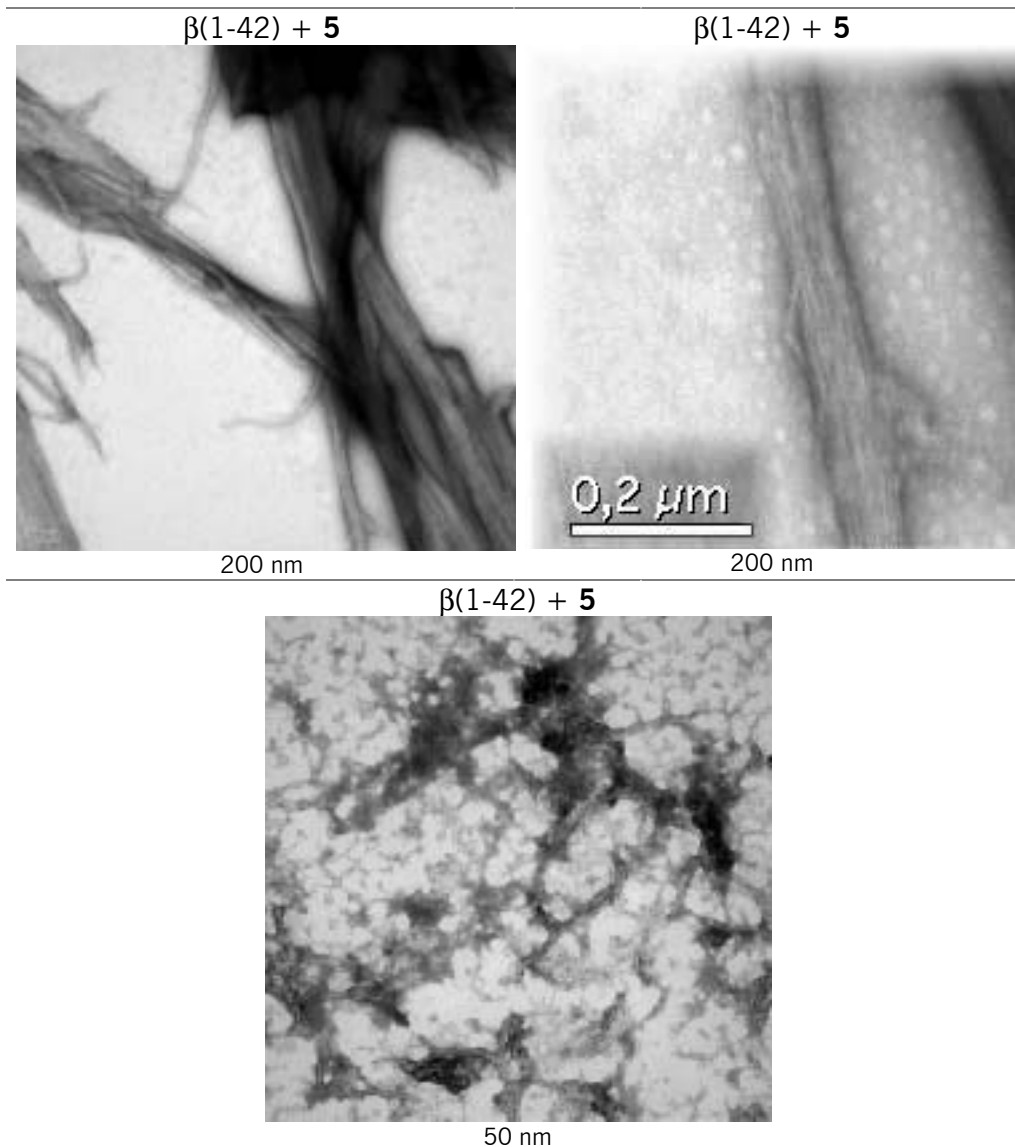


**Figura 74.** Micrografías de  $\beta(1-42)$  más el inhibidor 4. Muestras utilizadas en los ensayos biológicos (apartado 4.1.3). Bajo cada figura se indica la escala a la que corresponde la barra.



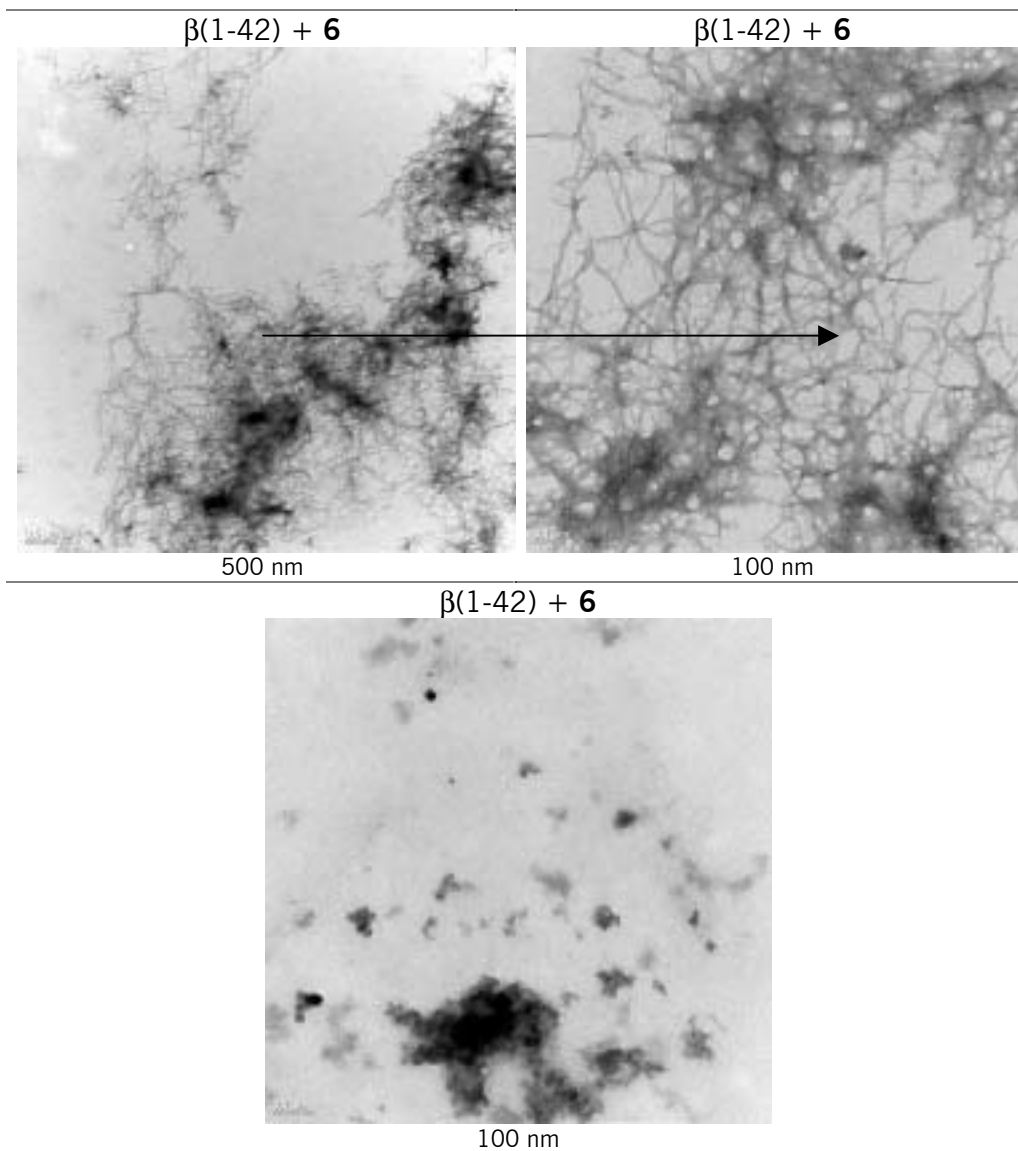
#### 4 Evaluación de los N-metilinhibidores

---



**Figura 75.** Micrográficas de  $\beta(1-42)$  más el inhibidor **5**. Muestras utilizadas en los ensayos biológicos (apartado 4.1.3). Bajo cada figura se indica la escala a la que corresponde la barra.

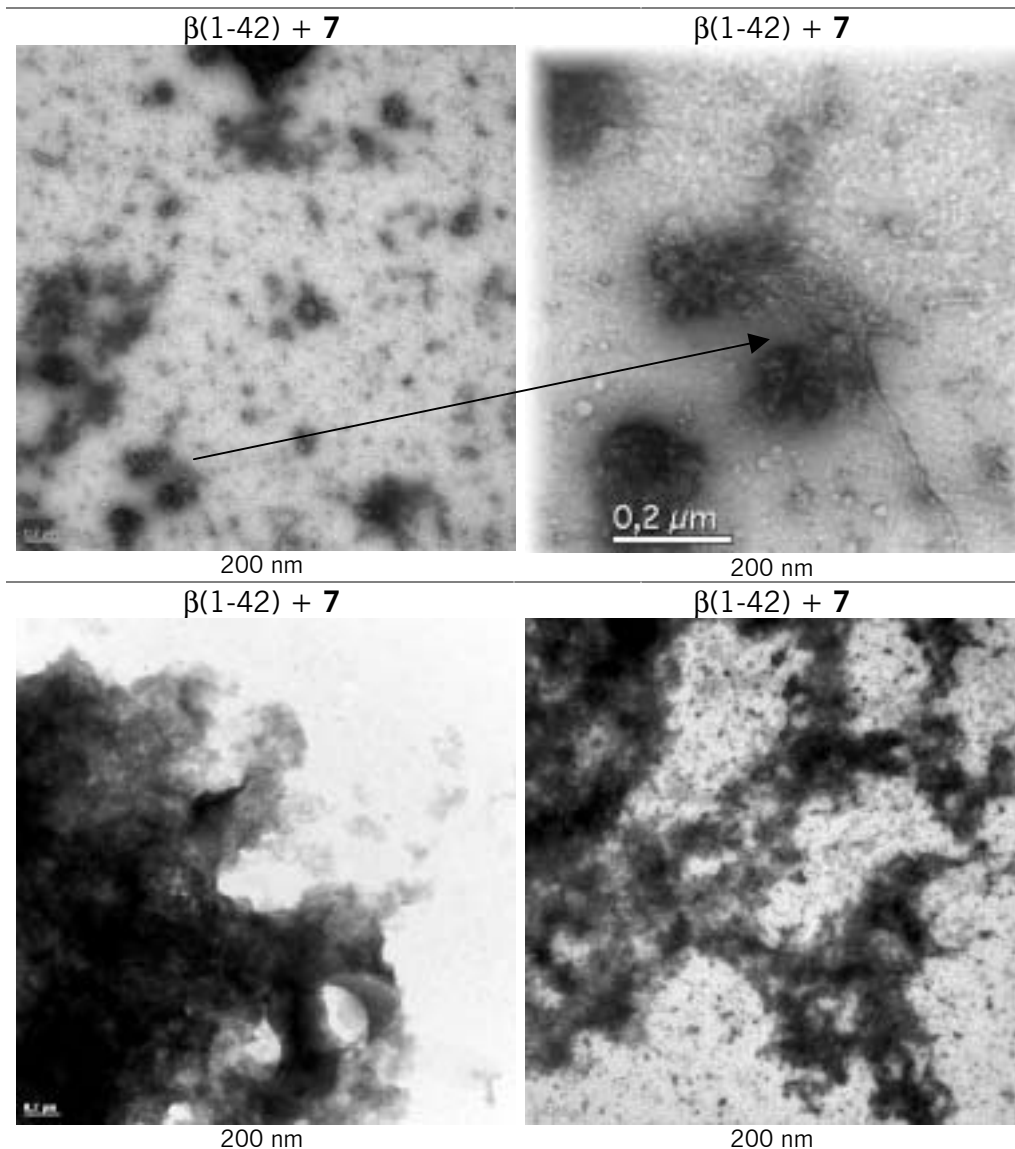
En la Figura 75 se presentan algunas micrográficas representativas de las mezclas de  $\beta(1-42)$  con el inhibidor **5**. Igual que en el caso de **4**, se aprecia la presencia de fibras pequeñas junto con estructuras amorfas, pero también se pudo observar la existencia de haces fibrilares de tamaño elevado en algunas preparaciones.



**Figura 76.** Micrografías de  $\beta(1-42)$  más el inhibidor **6**. Muestras utilizadas en los ensayos biológicos (apartado 4.1.3). Bajo cada figura se indica la escala a la que corresponde la barra.

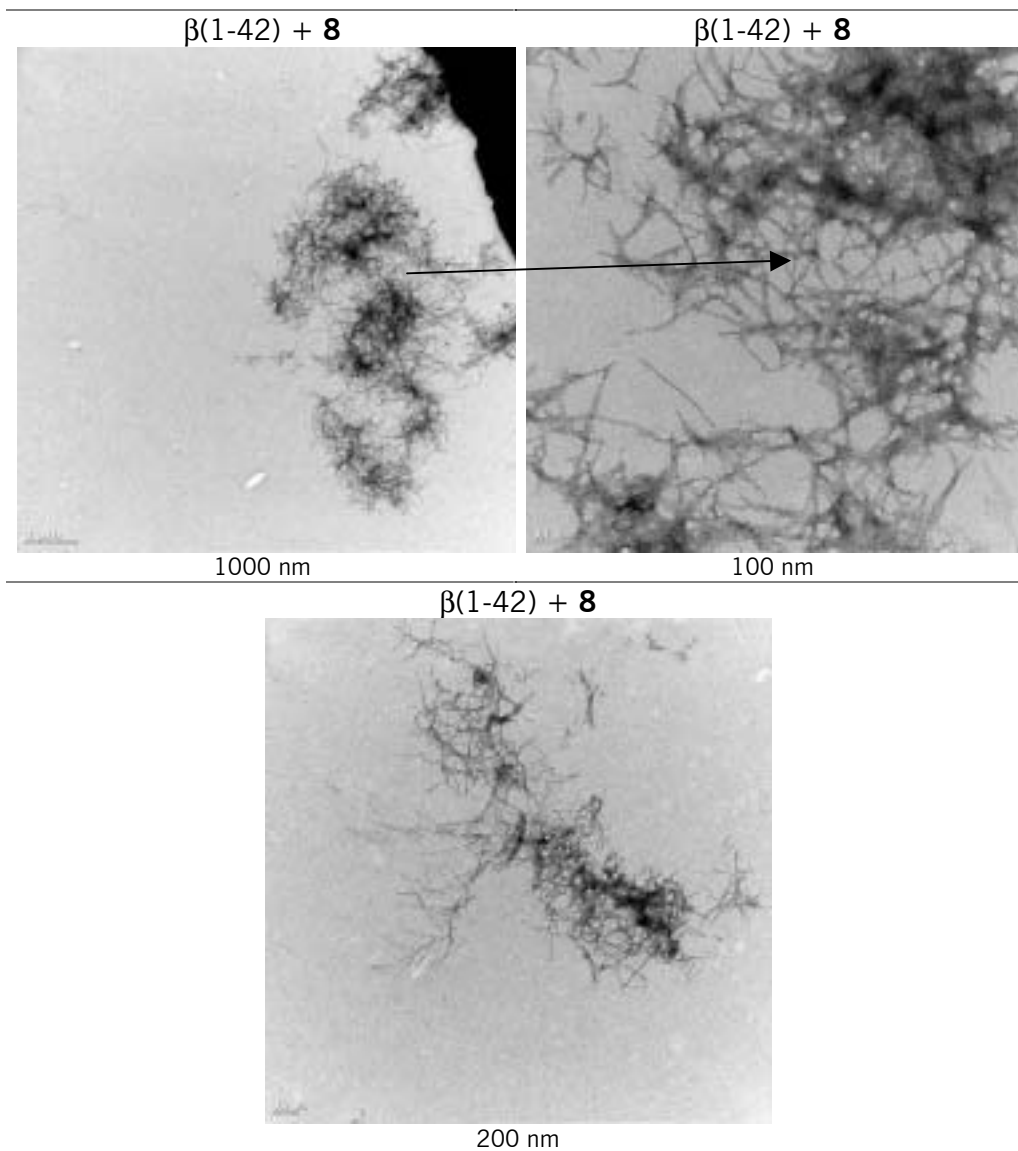
En el caso del inhibidor **6** podemos ver, en la Figura 76, la existencia tanto de fibras pequeñas como de agrupaciones de aspecto amorfo.

#### 4 Evaluación de los N-metilinhibidores



**Figura 77.** Micrografías de  $\beta(1-42)$  más el inhibidor **7**. Muestras utilizadas en los ensayos biológicos (apartado 4.1.3). Bajo cada figura se indica la escala a la que corresponde la barra.

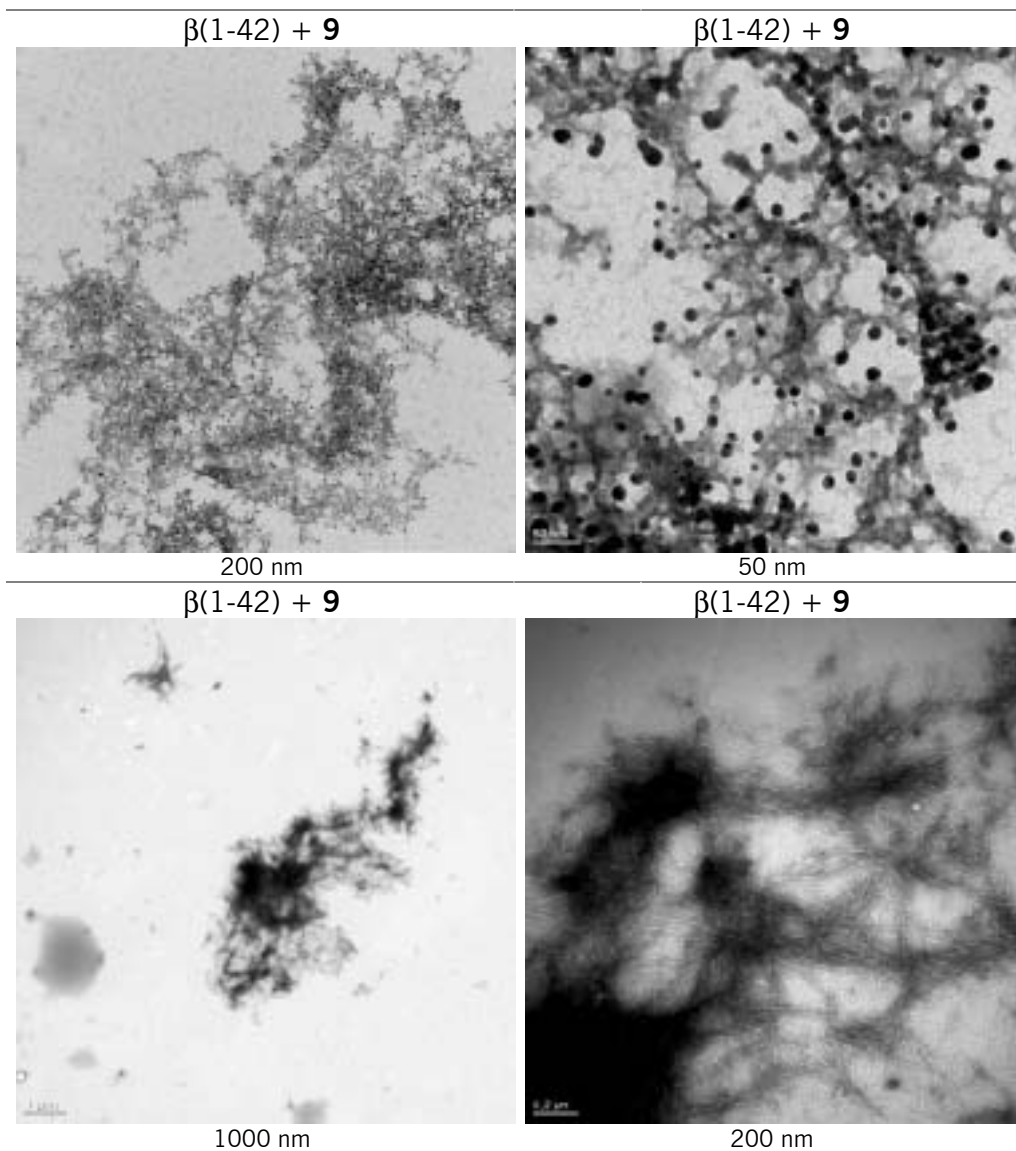
En la Figura 77 se muestran los dos tipos de estructuras observados en las preparaciones de **7**. Por un lado se pudieron observar fibras pequeñas aisladas y, por otro, estructuras aparentemente amorfas, como las que se presentan en las dos últimas imágenes (el uso de más aumentos no permitió determinar la existencia de fibras o de algún tipo de organización en estos agregados).



**Figura 78.** Micrografías de  $\beta(1-42)$  más el inhibidor **8**. Muestras utilizadas en los ensayos biológicos (apartado 4.1.3). Bajo cada figura se indica la escala a la que corresponde la barra.

Las micrografías obtenidas de  $\beta(1-42)$  junto con **8** son muy similares a las observadas en el caso de **6**, como se ve comparando la Figura 78 con la Figura 76 (aunque no se muestran, también se observaron algunos agregados amorfos).

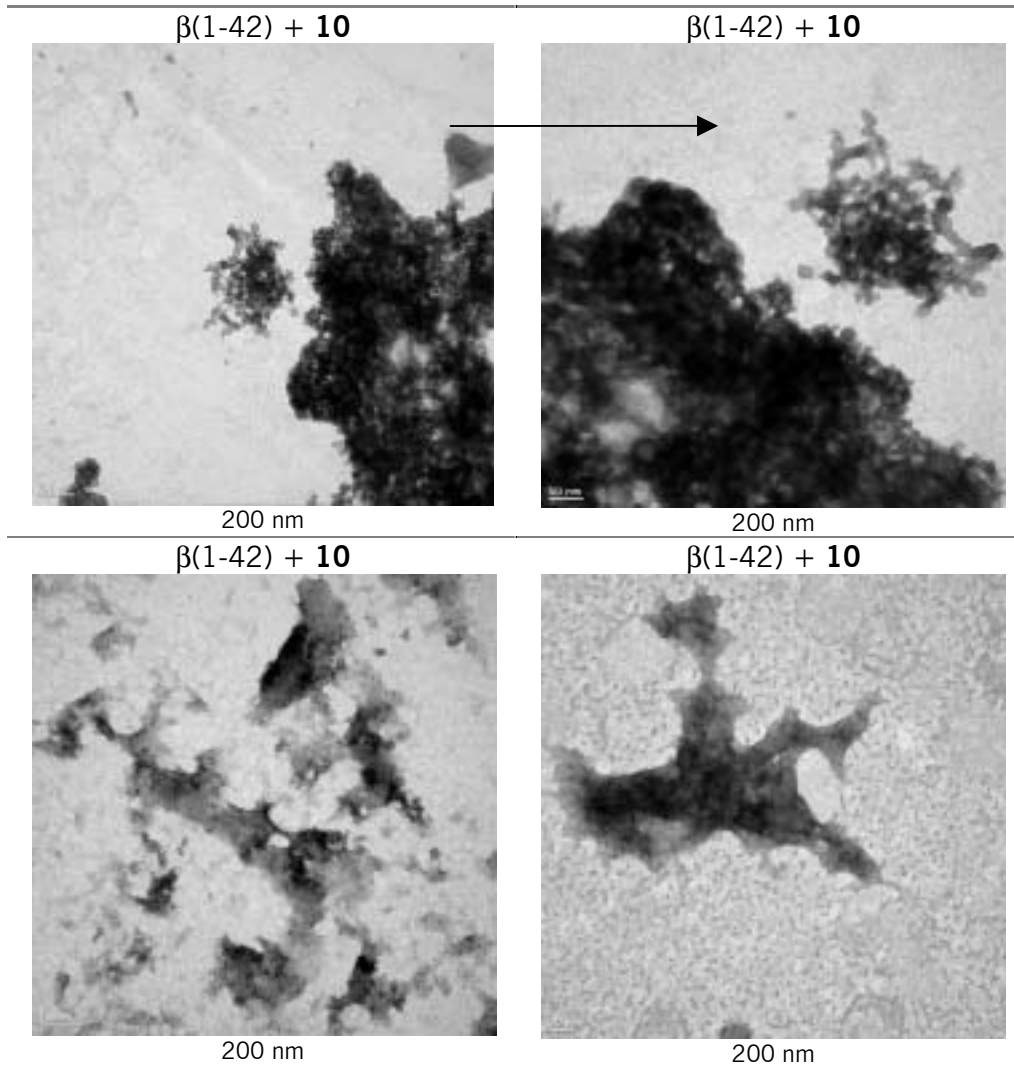
#### 4 Evaluación de los N-metilinhibidores



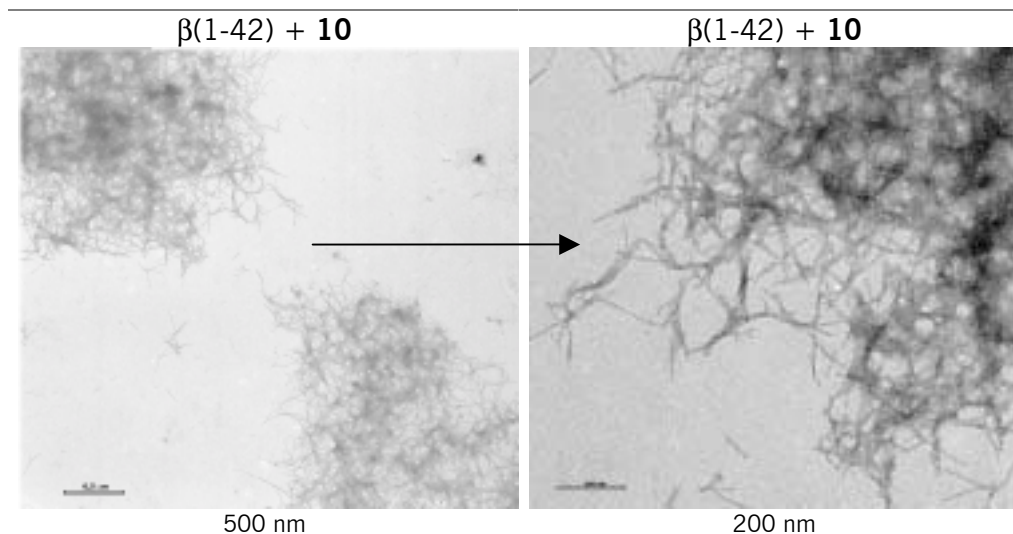
**Figura 79.** Micrografías de  $\beta(1-42)$  más el inhibidor **9**. Muestras utilizadas en los ensayos biológicos (apartado 4.1.3). Bajo cada figura se indica la escala a la que corresponde la barra.

El péptido  $\beta(1-42)$  en presencia del inhibidor **9** presentó, además de las fibras pequeñas típicas (es este caso aparecen teñidas en exceso, debido probablemente a la presencia de materia orgánica a su alrededor), un tipo de estructura que no se había observado previamente en ninguna preparación realizada en nuestro laboratorio, ni de  $A\beta$  solo, ni en combinación con inhibidor. En la Figura 79 se observa una estructura reticulada que recuerda a fibras entrecruzadas, pero con la diferencia de que cada filamento está terminado por una especie de bola esférica.

Algunos trabajos describen la presencia de estructuras esféricas, similares a las observadas en la Figura 79, durante las etapas iniciales del proceso de agregación<sup>154</sup>. Este tipo de estructura podría ser, por tanto, un indicio de la interferencia del inhibidor **9** en el proceso de agregación de A $\beta$ .



<sup>154</sup> Goldsbury, C. S.; Wirtz, S.; Müller, S. A.; Sunderji, S.; Wicki, P.; Aebi, U.; Frei, P. *J. Struct. Biol.* **2000**, *130*, 217-231.



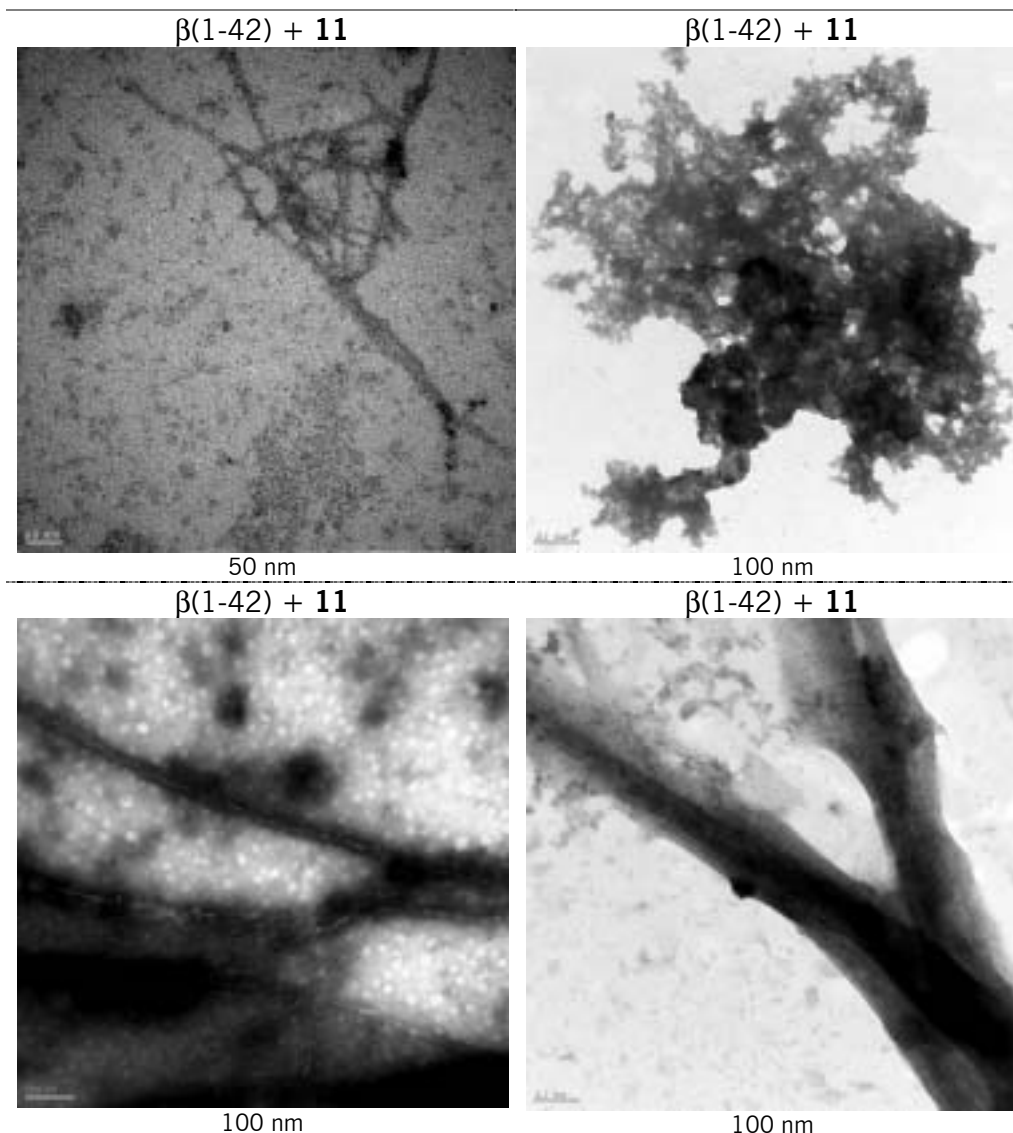
**Figura 80.** Micrografías de  $\beta(1-42)$  más el inhibidor **10**. Muestras utilizadas en los ensayos biológicos (apartado 4.1.3). Bajo cada figura se indica la escala a la que corresponde la barra.

En el caso del inhibidor **10**, e igual que sucede con **2**, se observan estructuras fibrilares, como se muestra en la Figura 80, a pesar de su actividad como inhibidor de la toxicidad de  $A\beta$  y de haberse descrito su capacidad para prevenir la agregación de  $A\beta$ <sup>155</sup>. En este caso, también se apreció la presencia de numerosas estructuras como las mostradas en las dos primeras imágenes de la Figura 80 y a las que se ha denominado “estructura de mosaico” en la presente tesis. Estas asociaciones de péptido son relativamente frecuentes, tanto en muestras con  $A\beta$  solo, como en mezclas, y no se ha podido determinar en la presente tesis si su naturaleza es fibrilar (como sugiere el aparente orden que presentan) o amorfo (a pesar de utilizar magnificaciones elevadas no es posible observar una estructura interna estriada, indicativa de una naturaleza fibrilar, quizás debido a su elevada densidad).

---

<sup>155</sup> Tjernberg, L. O.; Lilliehöök, C.; Callaway, D. J. E.; Näslund, J.; Hahne, S.; Thyberg, J.; Terenius, L.; Nordstedt, C. J. *Biol. Chem.* **1997**, 272, 12601-12605.





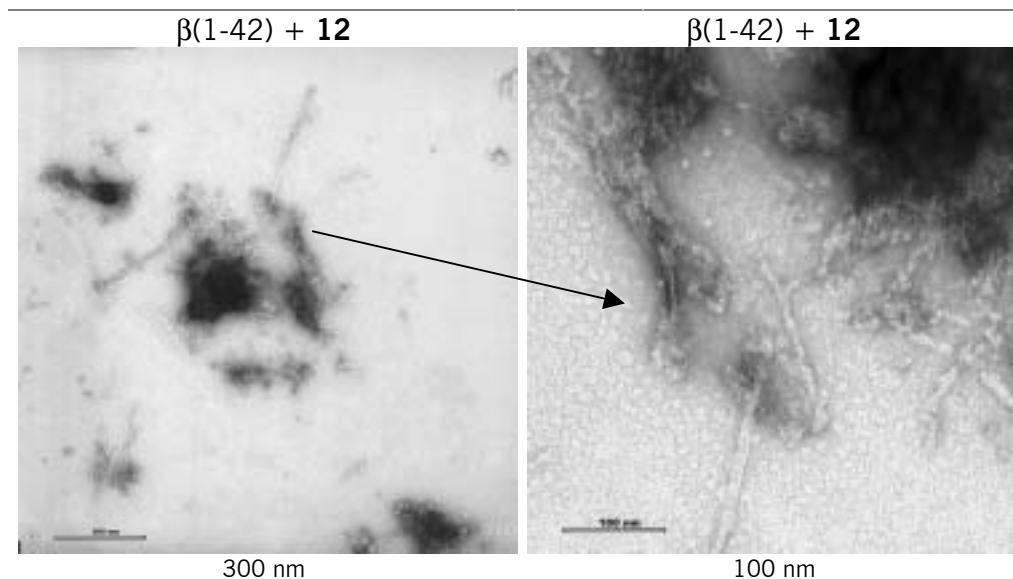
**Figura 81.** Micrografías de  $\beta(1-42)$  más el inhibidor **11**. Muestras utilizadas en los ensayos biológicos (apartado 4.1.3). Bajo cada figura se indica la escala a la que corresponde la barra.

En el caso de  $\beta(1-42)$  con el inhibidor **11** podemos observar, en la Figura 81, tanto fibras pequeñas aisladas como haces de fibras y estructuras amorfas. Según los experimentos descritos por Soto y colaboradores<sup>156</sup>, este inhibidor previene la formación de fibras, además de reducir la toxicidad de  $A\beta$ . En las condiciones en que se realizó el proceso de fibrillogénesis en nuestro laboratorio (utilizando  $\beta(1-42)$  y siguiendo el protocolo de preparación de muestra descrito en el apartado 8.2.1.2.3), no fue posible observar ninguno de estos comportamientos, aunque las fibras que se observaron parecen morfológicamente diferentes a las observadas en las preparaciones de  $A\beta$ .

<sup>156</sup> Soto, C.; Kindy, M. S.; Baumann, M.; Frangione, B. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1996**, 226, 672-680.

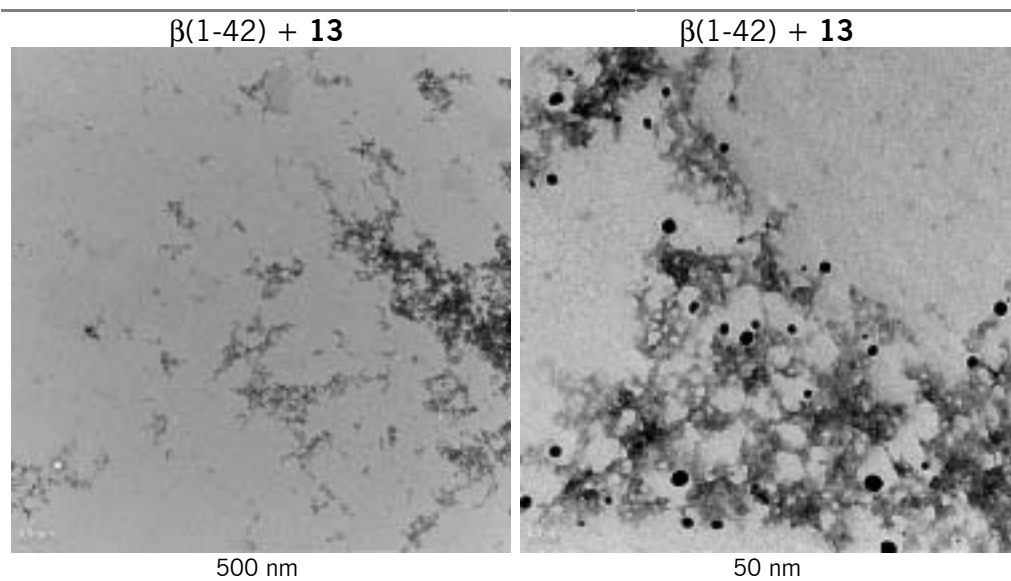
#### 4 Evaluación de los N-metilinhibidores

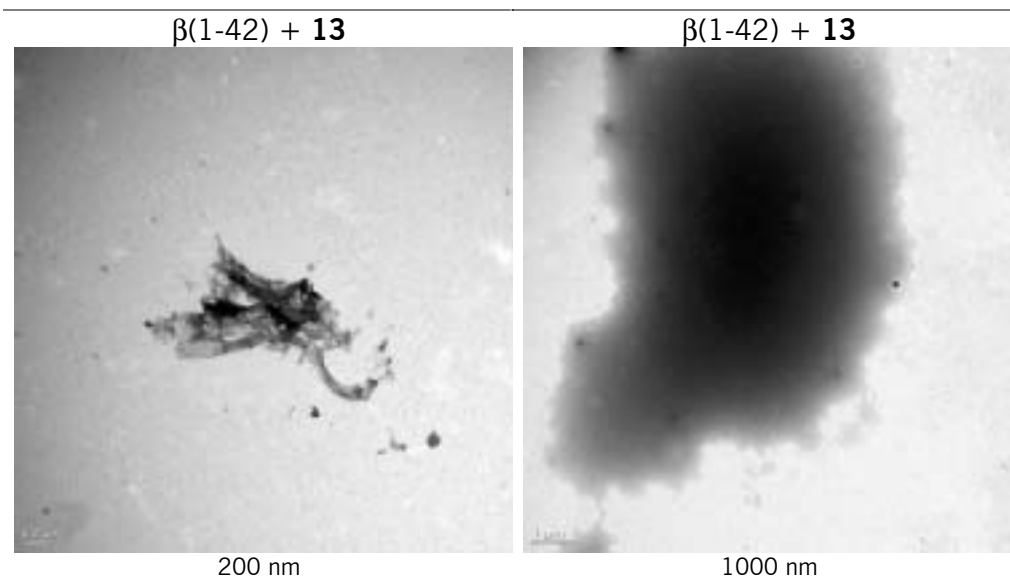
---



**Figura 82.** Micrografías de  $\beta(1-42)$  más el inhibidor **12**. Muestras utilizadas en los ensayos biológicos (apartado 4.1.3). Bajo cada figura se indica la escala a la que corresponde la barra.

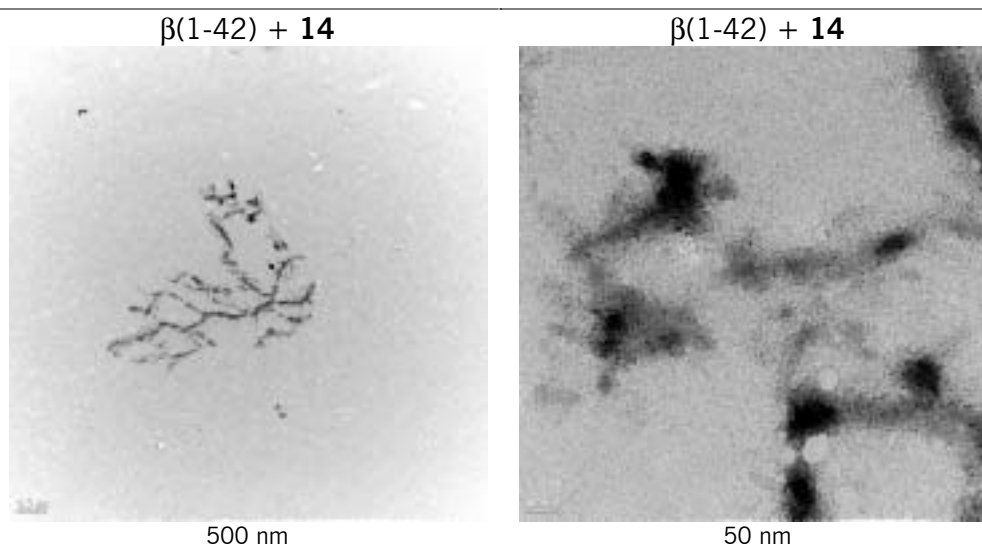
La Figura 82 muestra un ejemplo típico de las fibras pequeñas observadas en las mezclas de  $\beta(1-42)$  y **12**. También se pudieron observar algunas estructuras amorfas que no se muestran.





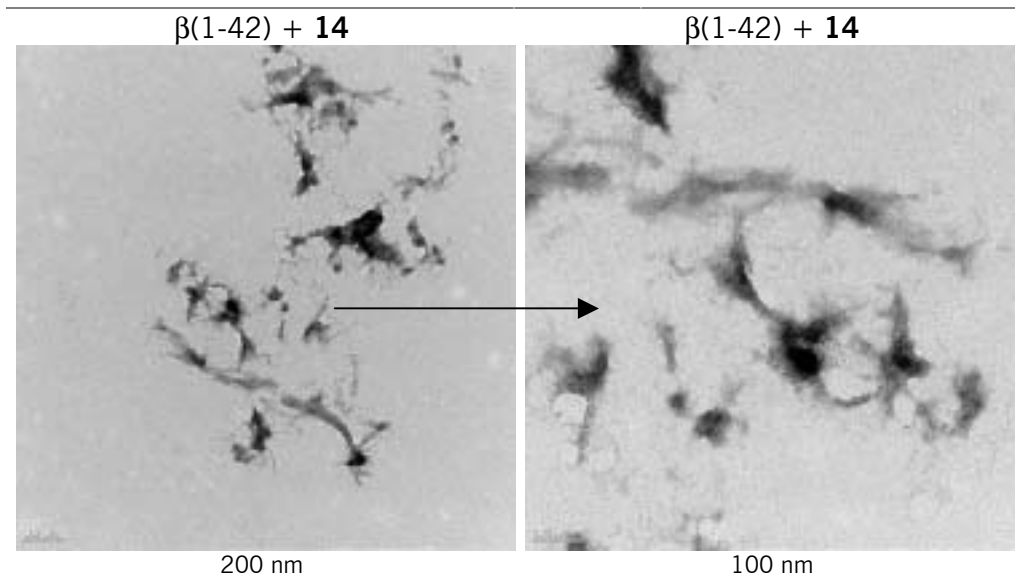
**Figura 83.** Micrografías de  $\beta(1-42)$  más el inhibidor **13**. Muestras utilizadas en los ensayos biológicos (apartado 4.1.3). Bajo cada figura se indica la escala a la que corresponde la barra.

En la Figura 83, igual que en la Figura 79, se observa que  $\beta(1-42)$  en presencia del inhibidor **13** vuelve a dar lugar a estructuras que recuerdan a fibras pequeñas entrelazadas o estructuras tipo mosaico, con esferas en los extremos. Además, se pudo observar la presencia de estructuras claramente amorfas, junto con otras que, a pesar de no poseer estructura interna estriada, recuerdan a haces de fibras. Nuevamente, e igual que sucede en el caso de  $\beta(1-42)$  y **9**, la presencia de estas esferas podría ser indicativa de una interacción entre  $A\beta$  y el inhibidor **13**.



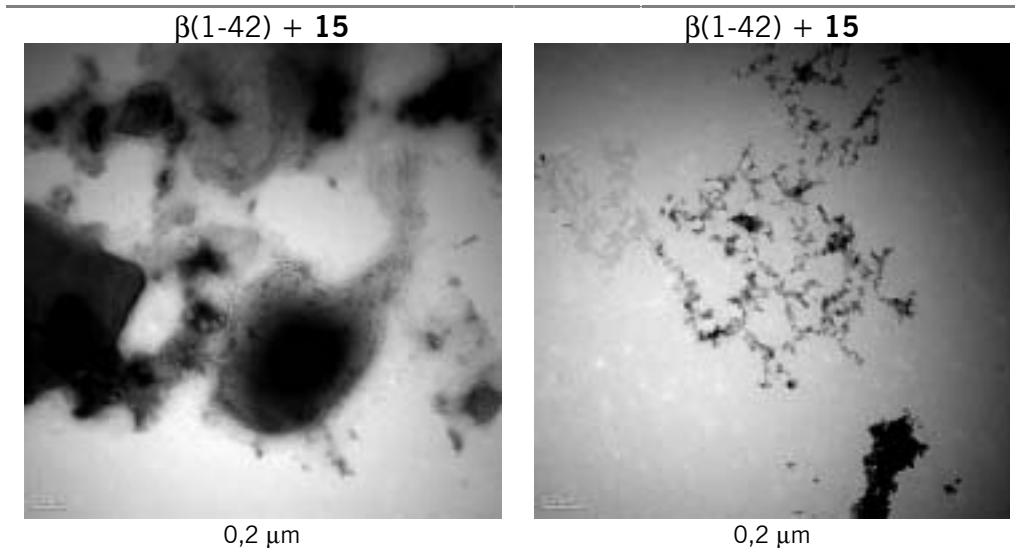
#### 4 Evaluación de los N-metilinhibidores

---



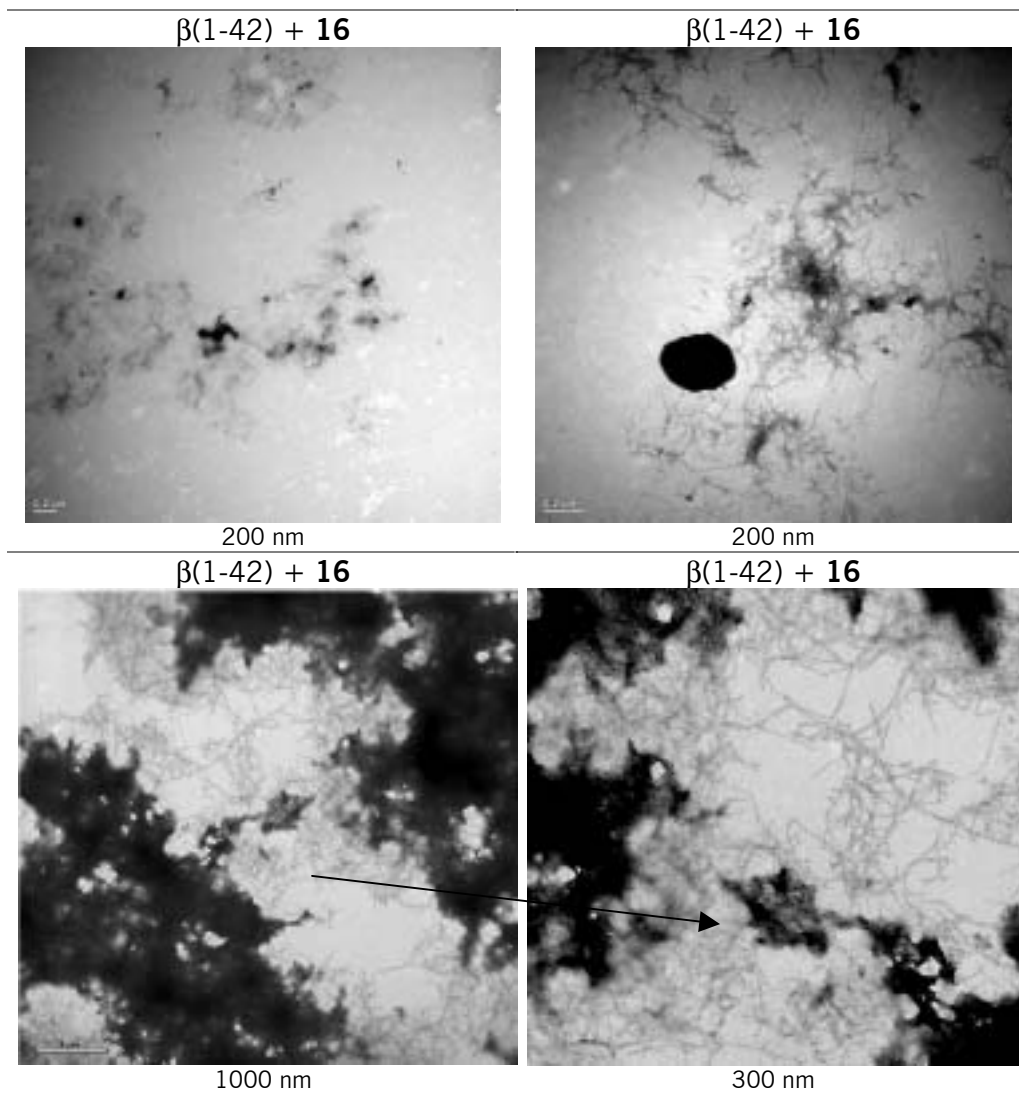
**Figura 84.** Micrografías de  $\beta(1-42)$  más el inhibidor **14**. Muestras utilizadas en los ensayos biológicos (apartado 4.1.3). Bajo cada figura se indica la escala a la que corresponde la barra.

La mezcla de  $\beta(1-42)$  con **14**, como muestra la Figura 84, rindió también estructuras fibrilares. Se pudieron apreciar pequeñas fibras amiloides entrecruzadas en sus extremos, aunque su dimensión, aparentemente más reducida de lo habitual, dificulta su localización (sólo el exceso de tinción en los nudos permite detectarlas).



**Figura 85.** Micrografías de  $\beta(1-42)$  más el inhibidor **15**. Muestras utilizadas en los ensayos biológicos (apartado 4.1.3). Bajo cada figura se indica la escala a la que corresponde la barra.

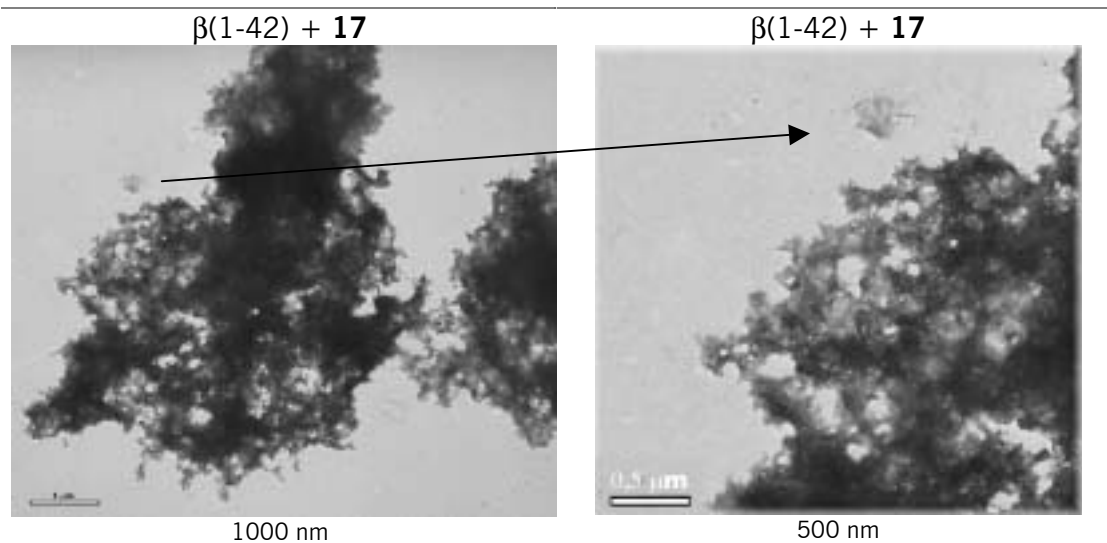
En el caso de  $\beta(1-42)$  con el inhibidor **15**, como se muestra en la Figura 85, se pudo detectar la presencia de fibras pequeñas rodeando a estructuras aparentemente amorfas (regiones con exceso de tinción), además de abundantes estructuras de tipo mosaico.



**Figura 86.** Micrografías de  $\beta(1-42)$  más el inhibidor **16**. Muestras utilizadas en los ensayos biológicos (apartado 4.1.3). Bajo cada figura se indica la escala a la que corresponde la barra.

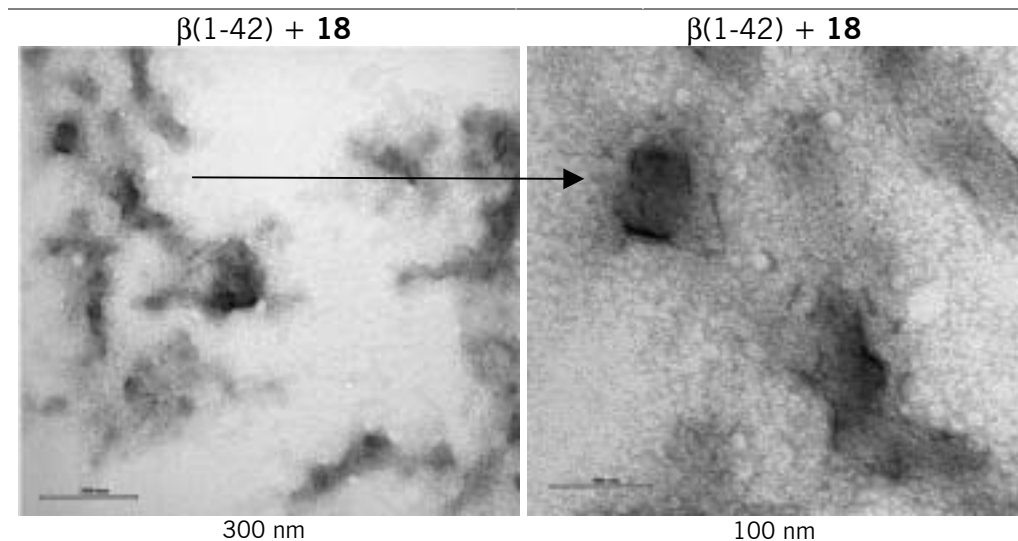
La Figura 86 muestra como  $\beta(1-42)$ , en presencia de **16**, no pierde tampoco su capacidad para formar fibras, observándose en este caso tanto fibras pequeñas como estructuras de apariencia amorfa.

#### 4 Evaluación de los N-metilinhibidores



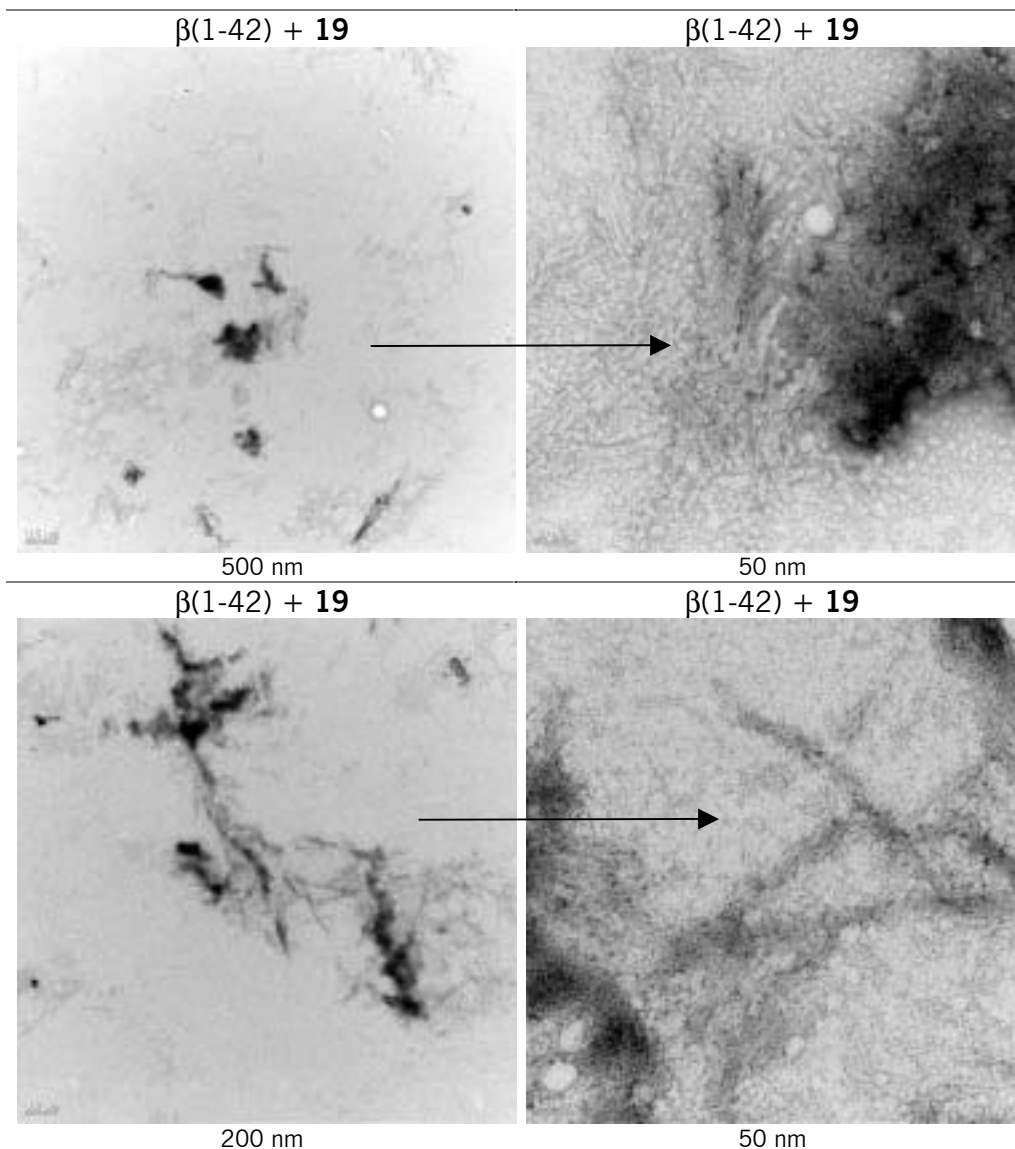
**Figura 87.** Micrografías de  $\beta(1-42)$  más el inhibidor **17**. Muestras utilizadas en los ensayos biológicos (apartado 4.1.3). Bajo cada figura se indica la escala a la que corresponde la barra.

En la Figura 87 se muestra un ejemplo de estructura de mosaico observado en la mezcla de  $\beta(1-42)$  y el inhibidor **17**. En este caso no se pudo observar la presencia de ninguna estructura de naturaleza fibrilar.



**Figura 88.** Micrografías de  $\beta(1-42)$  más el inhibidor **18**. Muestras utilizadas en los ensayos biológicos (apartado 4.1.3). Bajo cada figura se indica la escala a la que corresponde la barra.

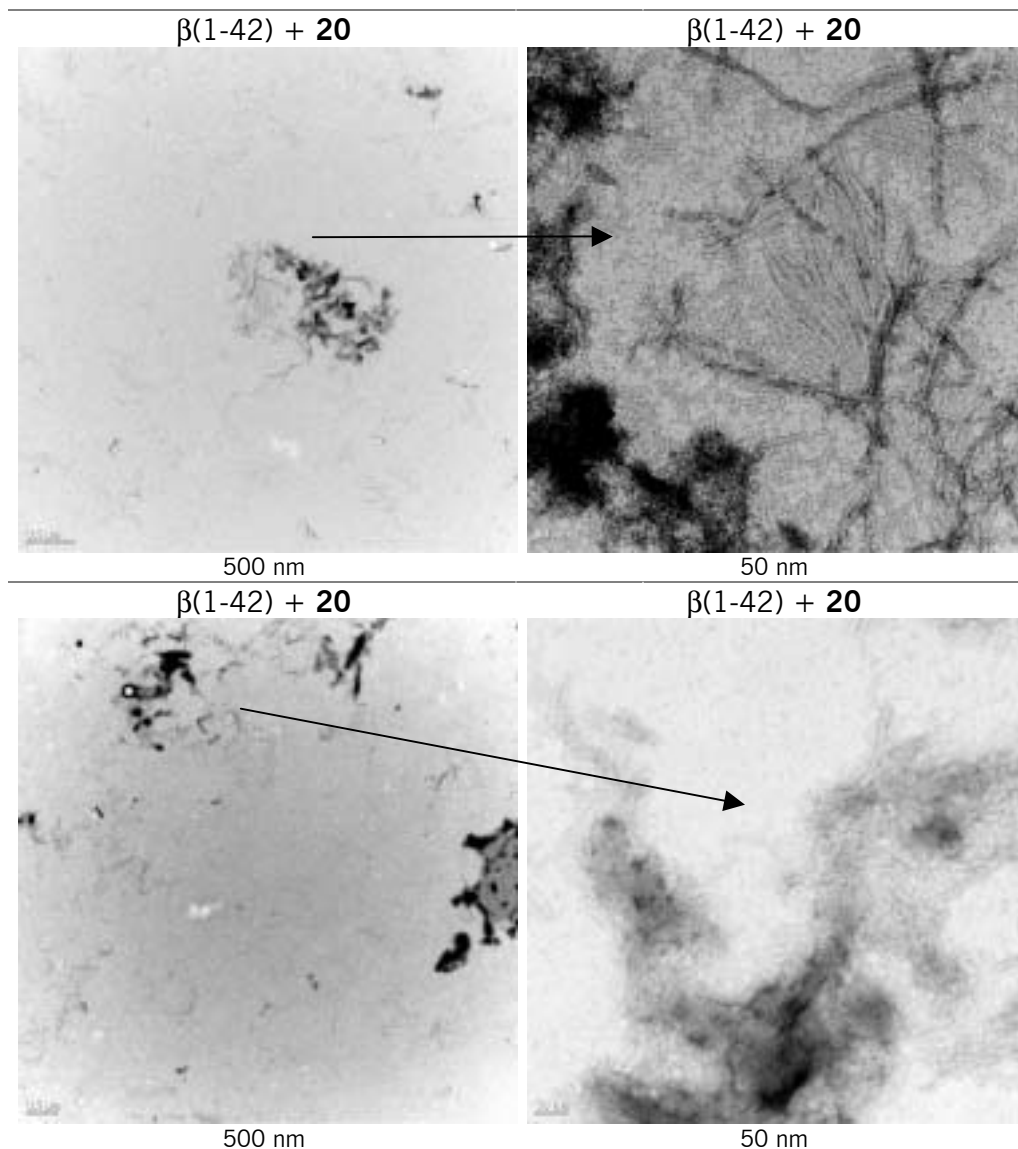
La Figura 88 muestra un ejemplo de las micrografías obtenidas de la mezcla  $\beta(1-42)$  y **18**. Se observaron numerosas fibras pequeñas, muy difuminadas, y entrelazadas. Además, también se encontraron algunos agregados tipo mosaico como los mostrados en la Figura 87.



**Figura 89.** Micrografías de  $\beta(1-42)$  más el inhibidor **19**. Muestras utilizadas en los ensayos biológicos (apartado 4.1.3). Bajo cada figura se indica la escala a la que corresponde la barra.

Nuevamente, en la Figura 89, se observan fibras pequeñas muy poco definidas. En el caso de la mezcla  $\beta(1-42)$  y el inhibidor **19** se observaron diversas asociaciones de este tipo, las cuales parecen estar fusionadas con las estructuras densas con las que se colocan.

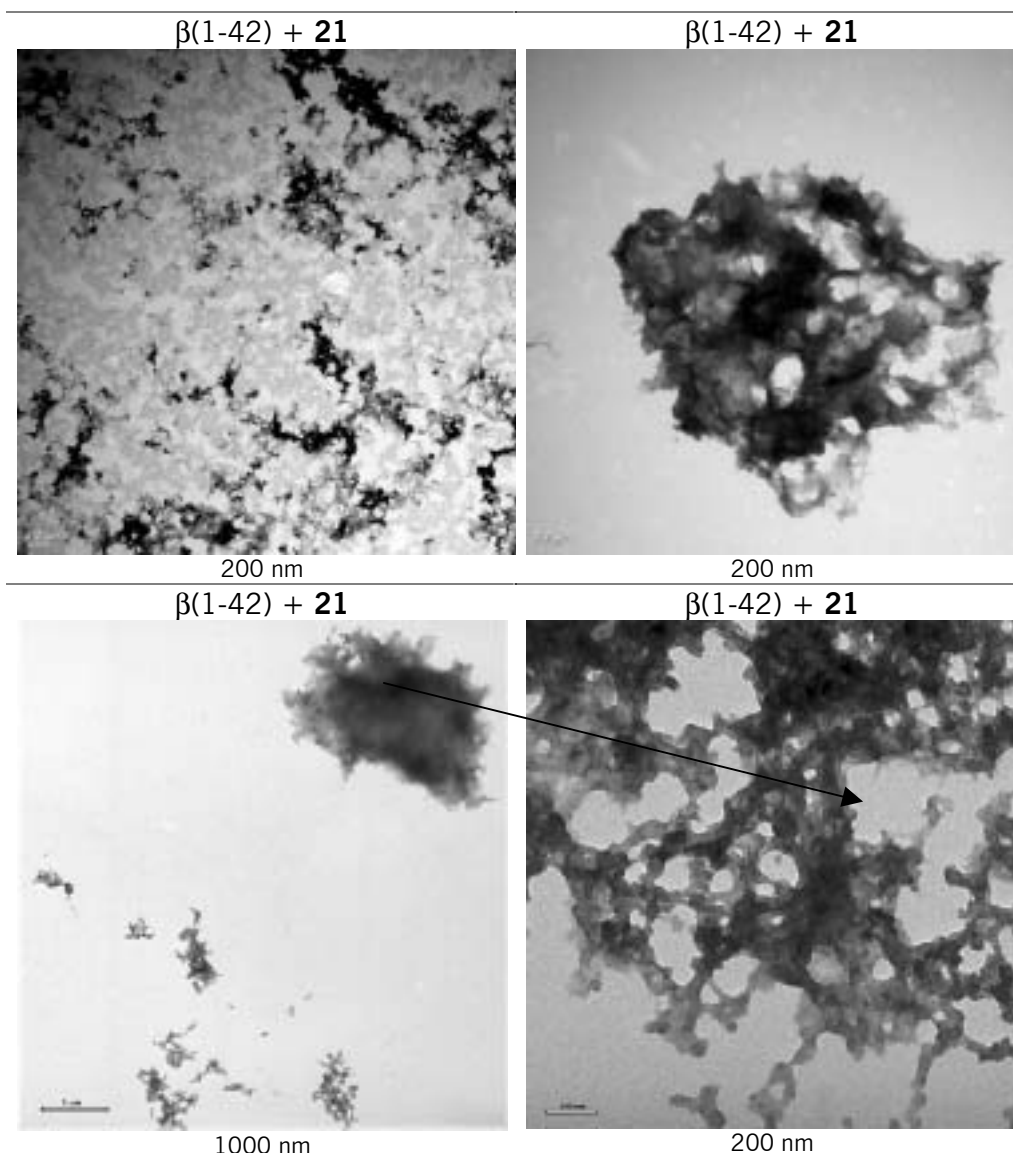
#### 4 Evaluación de los N-metilinhibidores



**Figura 90.** Micrografías de  $\beta(1-42)$  más el inhibidor **20**. Muestras utilizadas en los ensayos biológicos (apartado 4.1.3). Bajo cada figura se indica la escala a la que corresponde la barra.

La Figura 90 muestra cómo  $\beta(1-42)$  con el inhibidor **20** forma también fibras pequeñas, junto con estructuras más densas y sobreteñidas, similares a las mostradas en la Figura 89. En este caso, además, se pudo encontrar una zona con un nivel de contraste adecuado, lo que permite observar con detalle la disposición de diversas fibras pequeñas alineadas en forma de abanico.





**Figura 91.** Micrografías de  $\beta(1-42)$  más el inhibidor **21**. Muestras utilizadas en los ensayos biológicos (apartado 4.1.3). Bajo cada figura se indica la escala a la que corresponde la barra.

Por último, la observación de la mezcla de  $\beta(1-42)$  y el inhibidor **21** no permitió observar de forma clara ninguna estructura fibrilar, aunque sí que se detectó la presencia de algunas estructuras tipo mosaico, como las que se muestran en la Figura 91.

En resumen, el análisis de las micrografías obtenidas muestra que todas las mezclas  $A\beta$ -inhibidor, exceptuando a los inhibidores **17** y **21**, presentan algún tipo de estructura de carácter fibrilar en las preparaciones analizadas.  $A\beta$  en presencia de estos dos inhibidores sólo rindió estructuras tipo mosaico o amorfas. En el caso del inhibidor **13** tampoco se observaron estructuras fibrilares típicas, aunque los agregados observados recuerdan a agregados amiloides en formación<sup>154</sup>.

#### 4 Evaluación de los N-metilinhibidores

---

Este resultado explicaría la menor toxicidad que presenta A $\beta$  en presencia de **17** y **21**. Además, el inhibidor **13**, aunque a la concentración de trabajo habitual (5 eq respecto A $\beta$ ) no redujo la toxicidad de A $\beta$  de forma significativa, sí lo hizo a concentraciones más elevadas, lo que podría estar relacionado con la interferencia que producen, aparentemente, en el proceso de agregación.

No obstante, los resultados obtenidos mediante TEM han de evaluarse con precaución. La observación de fibras amiloides típicas permite confirmar que la proteína estudiada ha adoptado una estructura amiloide durante el proceso de envejecimiento. No obstante, el hecho de no detectar fibras amiloides no descarta totalmente la posibilidad de que éstas se formen en las condiciones del ensayo.